

Dinâmica dos hidratos de carbono não estruturais em *Quercus suber* L. e *Cistus ladanifer* L.

Joana Isabel dos Santos Martins

Dissertação para obtenção de Grau Mestre em
Engenharia Florestal e dos Recursos Naturais

Orientadores: Professora Auxiliar Maria da Conceição Brálio de Brito Caldeira
Doutora Raquel Lobo do Vale

Júri:

Presidente: Doutora Maria Margarida Branco de Brito Tavares Tomé, Professora catedrática do
Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Raquel Lobo do Vale, Investigadora do Instituto Superior de Agronomia da
Universidade de Lisboa

Doutora Clara Maria de Assunção Pinto, Bolseira de Projetos de Investigação do Instituto
Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

Agradecimentos

A concretização da presente dissertação teve o contributo indispensável de várias pessoas, às quais quero apresentar o mais sincero agradecimento. Com o seu apoio e encorajamento tornaram esta etapa mais fácil de enfrentar e finalizar.

Às minhas orientadoras, Professora Auxiliar Maria da Conceição Brálio de Brito Caldeira e Doutora Raquel Lobo do Vale, pelos ensinamentos, paciência, apoio e simpatia ao longo deste processo, e sobretudo por não terem desistido deste estudo, mesmo quando as dificuldades operacionais foram evidentes.

Ao Professor José Carlos Rodrigues (ISA), Ana Alves (ISA) e Nuno Costa (FCT), pelo seu contributo no procedimento prático nesta dissertação.

À minha “mãe” de laboratório, Ana Rodrigues, por toda a sua ajuda, encorajamento, ensinamentos, mas principalmente pelo seu bom humor e por ser uma boa ouvinte a todas as horas.

À Dona Lourdes, Dona Madalena e Joaquim Mendes, para além de toda ajuda no trabalho realizado, pela boa disposição e amizade.

Às sempre amigas e companheiras, em qualquer situação, Joana Prado, Ana Paula Gomes, Carolina Maggessi, Fabiana Fernandes, Raquel Carvalho, Daniela Fasero, Joana Sousa, e Rute Nogueira, apresento o meu agradecimento mais sincero, pelo apoio e encorajamento incondicional. Um obrigado particular ao Simon, pelo companheirismo e ensinamentos transmitidos tanto no campo como no laboratório.

Ao meu melhor amigo e parceiro, Rafael Teodósio, por estar sempre presente, pela sua enorme paciência, compreensão, amizade e amor que sempre me dedicou e sobretudo pelo seu encorajamento nas fases mais complicadas durante esta etapa. Um agradecimento especial também à Cristina Amaral, pela compreensão, força e boa disposição, que sempre me animou em qualquer momento.

Por último, o meu mais sincero obrigado aos meus pais e irmão, pelo apoio e motivação incondicional, mas acima de tudo por sempre acreditarem nas minhas capacidades e não só ensinarem-me a enfrentar os meus maiores desafios de cabeça erguida como me fazerem acreditar que existe sempre solução nas piores situações.

Resumo

Os ecossistemas mediterrâneos são vulneráveis aos impactes das alterações climáticas. As previsões do aumento da intensidade e frequência de eventos de seca e a expansão de espécies arbustivas são considerados os principais agentes que podem afetar o funcionamento destes ecossistemas. O presente estudo descreve as respostas fisiológicas do sobreiro (*Quercus suber* L.) sujeito a quatro tratamentos que incorporam dois fatores: ambiente/ seca induzida e invasão/ não invasão pela esteva (*Cistus ladanifer* L). Para este fim, monitorizou-se o potencial hídrico foliar, as trocas gasosas e os hidratos de carbono não estruturais (NSC, *non-structural carbohydrates*) em 36 sobreiros. Igualmente, foram amostradas 18 estevas, sujeitas aos tratamentos ambiente e seca induzida. O estudo foi realizado durante o ano hidrológico de 2019 (compreendido entre 1 de outubro de 2018 e 30 de setembro de 2019).

O principal objetivo deste estudo foi compreender as dinâmicas dos NSC nas duas espécies em estudo. Neste propósito, foram recolhidas amostras dos tecidos vegetais (folhas e ramos) de cada indivíduo. A amostragem dos tecidos vegetais foi realizada em quatro datas durante o ano hidrológico, permitindo analisar as flutuações sazonais das concentrações de amido e açúcares solúveis (SS, *soluble sugars*).

O potencial hídrico foliar e as trocas gasosas exibiram uma variação sazonal, verificando-se efeitos significativos principalmente da presença da esteva, originando nos meses mais secos um decréscimo nestes parâmetros do sobreiro. Os resultados preliminares dos NSC demonstraram que as concentrações de NSC, amido e SS, variaram sazonalmente nas duas espécies e entre tecidos. As folhas do sobreiro apresentaram concentrações de NSC superiores comparativamente às da esteva. Os ramos da esteva apresentaram concentrações superiores de amido comparativamente às folhas. No entanto, apenas foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de NSC nos ramos da esteva em outubro. Os resultados demonstraram a tolerância das duas espécies a condições de seca e aos tratamentos.

Palavras chave: Hidratos de carbono não estruturais, *Quercus suber* L., *Cistus ladanifer* L., adaptações, alterações climáticas.

Abstract

The Mediterranean ecosystems are regions considered vulnerable to the impacts of climate change. Predictions of an increase in frequency of drought events and the expansion of shrubs are considered the main drivers which can affect the functioning of these ecosystems. The present study describes the physiological responses of cork oak (*Quercus suber* L.) subjected to four treatments that embody two factors: ambient/induced drought and invasion/no invasion by rockrose (*Cistus ladanifer* L.). For this purpose, the leaf water potential, gas exchange, and non-structural carbohydrates (NSC) were measured in 36 individuals. Also, 18 rockrose individuals subjected to ambient and induced drought treatments were monitored. The study took place during the hydrological year of 2019 (between 1st of October 2018 and 30th September of 2019).

The main objective of this study was to understand the dynamics of NSC in both species. For this purpose, samples were collected from vegetable tissues (branches and leaves) of each individual. The sampling of tissues was performed in four dates of the hydrological year, enabling the observation of seasonal fluctuations on the concentration of starch and soluble sugars (SS).

The leaf water potential and gas exchange exhibited a seasonal fluctuation, displaying significative effects, mainly in the presence of rockrose, causing a decrease of these parameters in the cork oak during the driest months. The preliminary results of NSC showed that the concentration of NSC, starch and SS, varied seasonally and differed among the two species and between tissues. The leaves of cork oak showed a higher concentrations of NSC in relation to the rockrose. The branches of rockrose showed higher concentrations of starch in relation to leaves. However, statistically significant differences between treatments were only found in NSC concentrations of branches in October. The results showed the tolerance of both species to drought conditions and treatments.

Keywords: Non-structural carbohydrates, *Quercus suber* L., *Cistus ladanifer* L., adaptations, climate change.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice.....	v
Lista de figuras	vii
Lista de tabelas.....	ix
Lista de abreviaturas.....	x
1 Introdução.....	1
1.1 Ecossistemas mediterrânicos	1
1.1.1 O caso particular do montado	1
1.1.2 O clima e os seus cenários futuros	3
1.2 Estratégias adaptativas.....	5
1.3 O declínio e mortalidade da vegetação: as hipóteses	6
1.4 Hidratos de carbono não estruturais	8
1.4.1 As dinâmicas dos NSC na planta.....	9
2 Material e Métodos	14
2.1 Sítio experimental	14
2.2 Dados meteorológicos e teor de água do solo	15
2.3 Medições fisiológicas.....	16
2.4 Determinação dos NSC	17
2.5 Análise estatística.....	21
3 Resultados.....	22
3.1 Dados meteorológicos e teor de água no solo	22
3.2 Medições fisiológicas.....	25
3.2.1 Potencial hídrico foliar	25

3.2.2	Trocas gasosas	27
3.2.3	Hidratos de carbono não estruturais	30
4	Discussão	35
5	Conclusão.....	42
6	Referências bibliográficas	43
7	Anexos.....	52

Lista de figuras

- Figura 1 Previsões das mudanças na temperatura média anual ($^{\circ}\text{C}$; A) e na precipitação anual (%; B) para 2071-2100 em comparação com o período de referência 1971-2000 com base na média de um conjunto de multi-modelo forçado com o cenário de altas emissões RCP8.5. Fonte: EURO-CORDEX Data (2016)..... 4
- Figura 2 Diagrama com representação esquemática das hipóteses explicativas da mortalidade das árvores. 8
- Figura 3 Diagrama representativo da distribuição e funções dos NSC nos diversos tecidos da planta. O SS (soluble sugars) são os açúcares solúveis. Adaptado de Martínez-Vilalta et al. (2016)..... 11
- Figura 4 Parcelas com os diferentes tratamentos. a) AQ (Ambient + Quercus), b) AQC (Ambient + Quercus + Cistus), c) DQ (Drought + Quercus) e d) DQC (Drought + Quercus + Cistus). 15
- Figura 5 Estação meteorológica do bloco 1 (a), estação meteorológica do bloco 2 e 3 (b) e data logger onde são armazenados os dados medidos pelas sondas de humidade do solo (c). 16
- Figura 6 Temperatura média do ar, precipitação (mm) (A) e déficit de vapor de água (kPa) (B) nos três blocos, durante o ano hidrológico. As linhas contínuas pretas correspondem aos dias de amostragem de Ψ , trocas gasosas e NSC durante o estudo. As linhas a tracejado correspondem aos dias adicionais de amostragem dos Ψ 23
- Figura 7 Média diária do teor de água no solo para os quatro tratamentos (AQ; AQC; DQ; DQC) nas três profundidades diferentes (A = 0.05 m; B = 0.20 m; C = 0.40 m). As linhas pretas correspondem aos dias de amostragem de Ψ , trocas gasosas e NSC durante o estudo. As linhas a tracejado correspondem aos dias adicionais de amostragem dos Ψ . O asterisco indica diferenças significativas ($p < 0.05$). 24
- Figura 8 Potencial hídrico de madrugada, Ψ_{pd} e potencial hídrico do meio do dia, Ψ_{md} para os indivíduos de sobreiro (A e B) e esteva (C e D) nos diferentes tratamentos. A linha preta, Ψ_{50} , refere-se à margem de segurança hidráulica do sobreiro (-2.9 MPa) e da esteva (-6.2 MPa). Os

valores representam a média \pm erro padrão dos quatro tratamentos ($n = 9$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0.05$). A ausência de letras deve-se a não ocorrer diferenças significativas. Note-se que as escalas dos gráficos diferem. 27

Figura 9 Taxa de assimilação (A_{13h}), condutância estomática (g_{s13h}), taxa máxima de assimilação (A_{max}) e condutância estomática máxima (g_{smax}) para o sobreiro (esquerda) e esteva (direita) nos diferentes tratamentos. Os valores representam a média \pm erro padrão dos indivíduos nos quatro tratamentos ($n = 9$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0.05$). 29

Figura 10 Relação entre a condutância estomática (g_{s13h}) ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e o Ψ_{pd} (MPa) durante o período de amostragem para o sobreiro (A) e esteva (B). 30

Figura 11 Concentração de amido, açúcares solúveis (SS) e dos totais de NSC (%) nas folhas (esquerda) e ramos (direita) no sobreiro. Os valores representam a média \pm erro padrão dos tratamentos (n diferiu, ver Tabela A3). 32

Figura 12 Concentração de amido, açúcares solúveis (SS) e dos totais de NSC (%) nas folhas (esquerda) e ramos (direita) na esteva. Os valores representam a média \pm erro padrão dos indivíduos nos tratamentos (n diferiu, ver Tabela A4). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$). 33

Lista de tabelas

Tabela 1 Classe e funções dos diversos exemplos de açúcares. Adaptado de <i>Hartmann & Trumbore</i> (2016)..	9
Tabela 2 Médias da temperatura do ar (Tar) e do total da precipitação (P) nas quatro estações do ano do ano hidrológico de 2018/2019 e no período de referência, 1981-2010 (Évora, IPMA 2020). Δ representa a diferença percentual entre os valores registados durante o período de estudo e o período de referência.).	22
Tabela 3 Coeficiente de correlação de Spearman entre a taxa de assimilação de CO ₂ (A) e a concentração do amido, SS e NSC para o sobreiro (<i>Q. suber</i>) e esteva (<i>C. ladanifer</i>).....	34
Tabela A1 Síntese do GLM dos efeitos dos fatores no sobreiro (<i>Q.suber</i>) medidos nas respetivas datas de cada parâmetro. A referência (F) representa as folhas e o (R) representa os ramos dos indivíduos. Os modelos de GLM incluíram o “bloco” como fator aleatório e a “água”, “invasão” e “data” como fator fixo. Os resultados mostram a razão das duas variâncias (F) e a significância da probabilidade (p-value). Para p-value < 0.05 existe significância. O número “n” de indivíduos encontra-se na Tabela A3.	52
Tabela A2 Síntese do GLM dos efeitos dos fatores na esteva (<i>C. ladanifer</i>) medidos nas respetivas datas de cada parâmetro. A referência (F) representa as folhas e o (R) representa os ramos dos indivíduos. Os modelos de GLM incluíram o “bloco” como fator aleatório e a “água” e “data” como fator fixo. Os resultados mostram a razão das duas variâncias (F) e a significância da probabilidade (p-value). Para p-value < 0.05 existe significância. O número “n” de indivíduos encontra-se na Tabela A4.	53
Tabela A3 Valores referentes ao número (n) de indivíduos de sobreiro (<i>Q. suber</i>) nas folhas e ramos no período de amostragem de NSC.	54
Tabela A4 Valores referentes ao número (n) de indivíduos de esteva (<i>C. ladanifer</i>) nas folhas e ramos no período de amostragem de NSC.	55

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Designação
A	Taxa líquida de assimilação de CO ₂
A _{max}	Taxa máxima de assimilação de CO ₂
ANOVA	Análise de variância
GLM	Modelo Linear Generalizado
gs	Condutância estomática
gs _{max}	Condutância estomática à qual a taxa de assimilação é máxima
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HR	Humidade Relativa
NSC	Hidratos de carbono não estruturais
SS	Açúcares solúveis
SWC	Teor de água do solo
T _{ar}	Temperatura do ar
VPD	Défice de pressão de vapor
Ψ	Potencial hídrico foliar
Ψ ₅₀	Potencial hídrico foliar quando a planta perde 50% da condutividade
Ψ _{md}	Potencial hídrico foliar do meio dia
Ψ _{pd}	Potencial hídrico foliar de madrugada
Ψ _s	Potencial hídrico do solo
Ψ _x	Potencial hídrico do xilema

1 Introdução

1.1 Ecossistemas mediterrânicos

1.1.1 O caso particular do montado

Os montados de sobro são ecossistemas agro-silvo-pastoris dominados por sobreiro (*Quercus suber* L.) com uma estrutura do tipo savana. Os montados cobrem aproximadamente 1.5 milhões de hectares na Bacia Mediterrânica, concentrando-se maioritariamente a sul da Europa e Norte de África, e representando em Portugal 22% da área florestal (720 mil ha) (APCOR, 2018; ICNF, 2015; Kurz-Besson *et al.*, 2014). O sobreiro pertence à família das *Fagaceae*, e a particularidade de possuir uma camada espessa de cortiça na parte exterior da casca que reveste o tronco e os ramos, não só o distingue dos outros tipos de carvalhos (Costa & Pereira, 2007) como lhe confere uma barreira protetora contra perturbações (ex. fogo) (Aronson *et al.*, 2009). A cortiça é caracterizada por uma agregação de camadas de células suberizadas produzidas anualmente pelo felogénio (APCOR, 2018; Aronson *et al.*, 2009). A primeira extração da cortiça, processo denominado como descortiçamento, é realizada aproximadamente aos 25 anos e requer que o tronco possua um perímetro de 70 centímetros medidos à altura do peito (1.30 m do solo) (Decreto-Lei n.º 169/2001 de 25 de Maio do Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, 2001). Os descortiçamentos posteriores são realizados em períodos entre 9 a 12 anos. A remoção da cortiça deve ser realizada entre o final da primavera e início do verão, uma vez que é neste período que o felogénio se encontra ativo. Após a extração da cortiça as células do felogénio secam e morrem. Contudo, é formada outra camada de felogénio garantindo uma nova produção de cortiça (Natividade, 1950).

Os sobreiros são uma espécie de folha persistente de duração geralmente anual (Escudero *et al.*, 1992; Pereira *et al.*, 1987). As árvores adultas perdem as folhas do ano anterior concomitantemente com o crescimento das novas folhas, na primavera. No entanto, um segundo surto de crescimento de novas folhas pode ocorrer durante o outono, quando as condições ambientais são favoráveis (Fialho *et al.*, 2001; Lobo-do-Vale *et al.*, 2019). A floração ocorre entre março e junho, podendo em alguns casos prolongar-se até ao outono, e de julho a dezembro dá-se o aparecimento e maturação dos frutos (Humpheries *et al.*, 2005; Varela & Valdivieso, 1996). A longevidade destas árvores pode ultrapassar os 200 anos. O sobreiro é considerado uma espécie termófila (tolerante ao calor) e xerófila (tolerante à seca), sendo os valores ótimos de temperatura média anual entre 15 e 19°C e os de precipitação anual entre 600 e 800 mm (Costa

& Pereira, 2007). Relativamente à composição do solo, os sobreiros preferem solos profundos de textura leve com subsolo permeável de forma a proporcionar a expansão radicular e o arejamento (Costa & Pereira, 2007). No entanto, é uma espécie que predomina em solos derivados de substratos siliciosos e que está geralmente ausente de solos calcários (Aronson *et al.*, 2009).

Os montados de sobreiro são ecossistemas protegidos pela Rede Natura 2000, pois integram um conjunto de habitats onde coexiste uma grande diversidade de fauna e flora. Também o sobreiro é considerado Património Nacional desde 2011. A importância social e económica do montado é reconhecida devido ao aproveitamento comercial da cortiça. Estes ecossistemas são caracterizados por densidades entre 30 e 100 árvores/ha, por vezes misturados com azinheiras (*Quercus rotundifolia* Lam.) e, mais raramente, com espécies de resinosas (*Pinus pinaster* Aiton., *Pinus pinea* L.). O sub-bosque pode ser formado por uma heterogeneidade de formações arbustivas intercaladas com vegetação herbácea, ou por pousios e culturas de cereais (Díaz *et al.*, 1997). A vegetação herbácea é predominantemente composta por plantas anuais que completam o seu ciclo de vida no fim da primavera. A vegetação arbustiva é formada por uma diversidade de espécies como por exemplo *Arbutus unedo*, *Ulex* spp. ou *Cistus* spp. (Bugalho *et al.*, 2011), cujo papel é importante na produtividade do ecossistema exercendo uma grande influência no ciclo de nutrientes do solo e no balanço hídrico (Moreno-Marcos *et al.*, 2007; Otieno *et al.*, 2007).

No presente estudo, destaca-se o arbusto nativo da flora mediterrânea - *Cistus ladanifer* L. subespécie *ladanifer* - conhecido como esteva (Frazão *et al.*, 2018; Raimundo *et al.*, 2018). A esteva, espécie perene, pertencente à família *Cistaceae*, é um arbusto resinoso e aromático, muito resistente a fatores abióticos extremos, tais como secas, e solos extremamente degradados e pouco férteis e a fatores bióticos como ataques por insetos e doenças. A sua resistência a alterações ao nível das propriedades do solo (físicas, químicas e bioquímicas) e ao stresse induzido pela disponibilidade de água e de luz confere a este arbusto um elevado potencial adaptativo (Frazão *et al.*, 2018; Raimundo *et al.*, 2018).

Este arbusto tem um comportamento considerado invasor, pois possui elevadas taxas de crescimento, produção de sementes abundante e uma capacidade de expansão rápida, formando estratos monoespecíficos densos (estevais) capazes de dominar todo o ecossistema (Frazão *et al.*, 2018; Lecomte *et al.*, 2017). A combinação das perturbações antropogénicas, como o abandono da terra, e as alterações climáticas contribuem para o aumento da distribuição deste

arbusto (Caldeira *et al.*, 2015). A esteva é uma espécie xerófila que geralmente surge em solos pobres e ácidos, com origem em xistos, granitos e arenitos e é caracterizada por ser um arbusto viçoso e ereto com folhas verdes lanceoladas, dispostas em pares e no mesmo ângulo ao longo do caule. Na fase adulta, o arbusto pode alcançar os 2 metros de altura, tendo um sistema de raízes pouco profundas e densas. As folhas são sésseis (sem pecíolo) com nervos visíveis. O sistema foliar encontra-se impregnado de uma substância pegajosa e aromática com um aspeto brilhante, rica em compostos secundários, denominada de ládano (Frazão *et al.*, 2018; Haberstroh *et al.*, 2018).

A floração inicia-se aos 3-4 anos, e ocorre entre março e início de junho. As flores possuem uma longevidade curta (1-3 dias) e são compostas por cinco pétalas que podem apresentar duas variações nesta subespécie: a *albiflorus*, composta por pétalas totalmente brancas e a *maculatus*, formada por pétalas brancas com uma mancha castanho-avermelhada na base de cada pétala (Frazão *et al.*, 2018; Raimundo *et al.*, 2018; Talavera *et al.*, 1993). No período do outono e inverno, este arbusto propaga-se naturalmente por germinação de sementes (Lecomte *et al.*, 2017; Raimundo *et al.*, 2018). A sua cápsula (fruto) pode ser dividida em 9-10 compartimentos e conter cerca de 1000 sementes. As sementes possuem uma forma poliédrica e são pequenas (0.5 - 1 mm) e de reduzido peso (0.27 mg), o que contribui não só para a acumulação e penetração nos solos como para a formação de bancos de sementes no solo (Frazão *et al.*, 2018). As sementes também possuem uma proteção impermeável conferida pela casca. A esteva detém um papel fundamental na ocupação e no funcionamento dos ecossistemas, uma vez que é um arbusto rústico e que tem uma estratégia “gastadora” de água, com taxas de transpiração superiores a outras espécies (Caldeira *et al.*, 2015; Frazão *et al.*, 2018).

1.1.2 O clima e os seus cenários futuros

O clima mediterrâneo possui uma forte sazonalidade e variabilidade, caracterizado por verões quentes e secos e invernos relativamente amenos e húmidos (IPCC, 2007). De acordo com o Boletim Climatológico Anual de Portugal Continental apresentado pelo Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), a temperatura média do ar do país tem sofrido um aumento gradual ao longo dos últimos 90 anos (IPMA, 2020). No presente século, as alterações climáticas são consideradas um dos mais sérios desafios que o planeta enfrenta (Viceto *et al.*, 2019). As previsões climáticas para a Península Ibérica indicam um aquecimento acentuado na maior parte das regiões, principalmente da temperatura máxima, e durante o verão (Figura 1). Estas

alterações serão também acompanhadas por um aumento da variabilidade da precipitação. De igual forma, o aumento das ondas de calor e a diminuição dos períodos de frio também são projetados para esta região (IPCC, 2014; Viceto *et al.*, 2019).

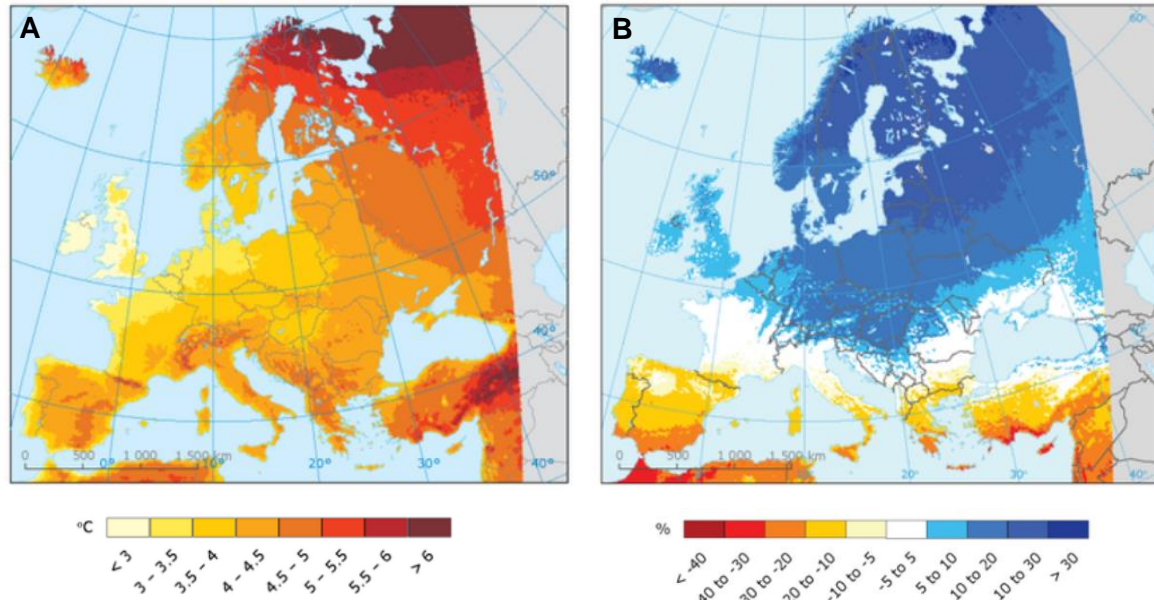


Figura 1 Previsões das mudanças na temperatura média anual (°C; A) e na precipitação anual (%; B) para 2071-2100 em comparação com o período de referência 1971-2000 com base na média de um conjunto de multi-modelo forçado com o cenário de altas emissões RCP8.5. Fonte: *EURO-CORDEX Data* (2016).

A combinação do aumento da temperatura com as mudanças nos padrões de precipitação proporciona o aumento da intensidade e frequência de episódios de seca (Choat *et al.*, 2012; IPCC, 2014). O aumento da temperatura provoca, também, um aumento das taxas de evapotranspiração, que corresponde à água evaporada do solo para a atmosfera e à perda de água pelas plantas através da transpiração (Choat *et al.*, 2018). A seca é um dos principais distúrbios naturais que resulta de valores de precipitação significativamente menores que a média de longo-prazo (por exemplo, entre 1981 e 2010), durante um determinado período de tempo, contribuindo para que a disponibilidade em água seja inferior às necessidades da planta (Choat *et al.*, 2018; Sevanto *et al.*, 2014; Vicente-Serrano *et al.*, 2012). As secas prolongadas determinam uma diminuição da quantidade de água disponível no solo, e um decréscimo do potencial hídrico do solo (ψ_s). Por sua vez, a disponibilidade de água na planta diminui provocando o aumento da tensão no xilema, a dessecação e em casos mais graves, a morte da planta (Choat *et al.*, 2018; Martínez-Vilalta & Garcia-Forner, 2017).

O período de recuperação que sucede a episódios de seca é um processo complexo, dinâmico e determinado por quatro parâmetros: i) grau de danificação dos tecidos apicais e merismáticos após a seca; ii) estado funcional do xilema; iii) estado sanitário das árvores, desde as folhas às raízes e iv) a água, os hidratos de carbono não estruturais e os nutrientes disponíveis para a fase de recuperação (Choat *et al.*, 2018).

1.2 Estratégias adaptativas

As plantas, sendo organismos sésseis, não podem escapar às condições ambientais prevalentes, tendo desenvolvido e/ou possuindo adaptações de forma a tolerar ou a evitar os stresses variados (Hartmann *et al.*, 2018). A vulnerabilidade das espécies às alterações climáticas (i.e. severidade do impacto das alterações climáticas, Lindner *et al.*, 2010) varia com a exposição às alterações impostas, a sensibilidade e capacidade de adaptação das espécies para responder a essas alterações (Mitchell *et al.*, 2013). As estratégias adaptativas face ao défice hídrico contribuem para a manutenção da integridade do sistema vascular da planta e, embora compreendam uma diversidade de parâmetros, são definidas de forma geral por duas restrições: os limites físicos do sistema vascular e a capacidade de manter o potencial hídrico entre os limites funcionais de forma a promover a ascensão hidráulica desde raízes até às folhas proporcionalmente à taxa de transpiração (Choat *et al.*, 2018).

O sobreiro é uma espécie com adaptações a nível fisiológico, morfológico e anatómico que lhe permitem otimizar o uso da água, evitando ultrapassar os limites fisiológicos para a sua sobrevivência (Caldeira *et al.*, 2015; David *et al.*, 2013; Kurz-Besson *et al.*, 2014). Por exemplo, a nível foliar, o fecho dos estomas induzido pelo stresse hídrico restringe a perda excessiva de água pela transpiração e os danos de desidratação das células e tecidos da planta, mas também reduz a fotossíntese. No entanto, o ajustamento osmótico pode aumentar a capacidade de absorção de água permitindo que os estomas se mantenham abertos por mais tempo. O extenso sistema radicular do sobreiro permite a absorção de água nas camadas mais profundas e, através da redistribuição hidráulica, contribui para o aumento do transporte e da disponibilidade de água em toda a planta (David *et al.*, 2013; Dubbert *et al.*, 2019; Kurz-Besson *et al.*, 2014; Otieno *et al.*, 2007). Por fim, a redução do diâmetro dos vasos do xilema proporciona uma maior resistência à cavitação, e a diminuição da área foliar específica (área da folha por unidade de massa dessa folha) permite evitar a perda excessiva de água por transpiração. Face aos episódios de seca,

estas adaptações conferem ao sobreiro um alto grau de resiliência (Pinto *et al.*, 2012; David *et al.*, 2013).

1.3 O declínio e mortalidade da vegetação: as hipóteses

Como referido anteriormente, a seca prejudica os ecossistemas a diversos níveis. O aumento da frequência e intensidade destes episódios têm sido identificados como o principal fator causador do declínio e mortalidade da vegetação (Reichstein *et al.*, 2013; Rosas *et al.*, 2013). No caso dos sobreiros, este declínio e mortalidade também têm sido associados ao estabelecimento e expansão da esteva (Acácio *et al.*, 2009). Os mecanismos fisiológicos subjacentes às causas de mortalidade ainda são pouco compreendidos. No entanto, podem ser formalizadas duas hipóteses a respeito dessas causas, isto é, a falha hidráulica (*hydraulic failure*) e/ou a carência de carbono (*carbon starvation*) (Figura 2) (Hammond *et al.*, 2019; McDowell, 2011; Rosas *et al.*, 2013).

A primeira hipótese, falha hidráulica, é expectável de suceder durante eventos de seca extrema, nos quais a perda de água pela transpiração comparativamente à absorvida pelas raízes é excedida criando um stresse hídrico nas plantas que é manifestado por tensões elevadas nos vasos do xilema (Sevanto *et al.*, 2014). O estado hídrico em que a planta se encontra é aferido pelo potencial hídrico do xilema (Ψ_x), que por sua vez, é determinado pela pressão da água neste tecido (Choat *et al.*, 2018). Os tecidos do xilema transportam a água necessária para as diversas funções da planta, como a fotossíntese, crescimento e reprodução. A desidratação das plantas leva à perda de turgescência das células, conduzindo ao fecho dos estomas e à perda da condutividade do xilema, o que pode provocar níveis de embolismo irreversíveis. A cavitação ou embolismo resulta de tensões muito elevadas no xilema que podem originar uma mudança de fase da água do estado líquido para o gasoso, ocorrendo uma quebra da continuidade da coluna de água no xilema (Choat *et al.*, 2012; Rosas *et al.*, 2013; Sevanto *et al.*, 2014). A resistência ao embolismo representa uma característica importante na determinação dos limites toleráveis das espécies à seca e é referida como a relação entre a pressão de água nos vasos do xilema, medida pelo Ψ_x , e a perda da condutividade hidráulica da planta. O indicador mais comumente utilizado para descrever a resistência ao embolismo é o Ψ_x correspondente a 50% de perda de condutividade hidráulica (Ψ_{50}). Assim, quando o Ψ_x apresenta valores inferiores ao Ψ_{50} , o transporte de água no xilema estará seriamente comprometido e a planta estará exposta a um

grande risco de embolismo massivo, que conduzirá a perdas de produtividade, danos nos tecidos e, em última instância, à morte da árvore (Choat *et al.*, 2012).

No entanto, os efeitos da seca podem-se refletir de forma mais ou menos progressiva nas plantas na medida em que a seca pode ser de curto a longo prazo. A curto prazo, o fecho gradual dos estomas como forma de prevenir a perda de água e evitar a falha hidráulica irá reduzir a fotossíntese (McDowell *et al.*, 2008; McDowell, 2011). Neste período, a perda de turgescência das células diminui a taxa de crescimento comparativamente à fotossíntese conduzindo a uma redução do consumo dos compostos fotoassimilados da planta (Hartmann & Trumbore, 2016; McDowell, 2011). No caso de secas prolongadas, o fecho progressivo dos estomas devido à diminuição severa da quantidade de água transportada entre os tecidos da planta através do xilema contribui para um balanço negativo de carbono na planta (Choat *et al.*, 2018). O balanço negativo de carbono, induzido pela reduzida taxa de carbono assimilado pela fotossíntese, pode conduzir ao consumo de todas as reservas de carbono, necessárias quer para a manutenção das funções metabólicas quer para a sobrevivência da planta, e consequentemente provocar a sua morte. Nesta situação, a morte da árvore poderá ocorrer por carência de carbono, de acordo com a hipótese de carência de carbono (Hartmann & Trumbore, 2016; McDowell, 2011). A diminuição da quantidade de água transportada também interfere na translocação dos compostos assimilados nos tecidos da planta através do seu efeito no floema (McDowell *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2013; Sevanto *et al.*, 2014). A carência de carbono pode ser potenciada quando as temperaturas são elevadas, em que há um aumento do consumo dos compostos assimilados como resultado do incremento da respiração (McDowell *et al.*, 2008). No entanto, os processos de falha hidráulica e de carência de carbono encontram-se estreitamente relacionados (Caldeira, 2019; McDowell *et al.*, 2011) na medida em que não só as características hidráulicas da planta são importantes na determinação da sua sobrevivência face à seca e na dinâmica do carbono como também é necessário ocorrer um equilíbrio de forma a aumentar a absorção de carbono e a diminuir a perda de água ao nível da superfície da folha (Choat *et al.*, 2018; Mitchell *et al.*, 2013). Esta forte interdependência entre as duas hipóteses, da falha hidráulica e carência de carbono, determina que a mortalidade das árvores é muito provavelmente resultante de uma combinação diversa das duas causas que é importante determinar.

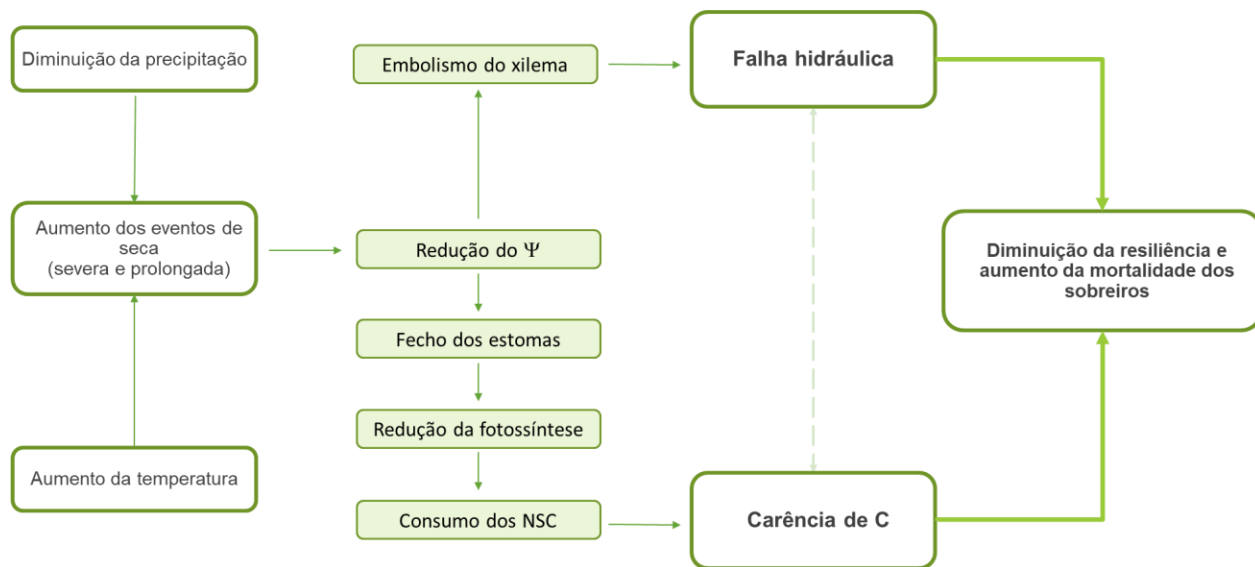


Figura 2 Diagrama com representação esquemática das hipóteses explicativas da mortalidade das árvores.

1.4 Hidratos de carbono não estruturais

Nas plantas, uma pequena fração do carbono (C) assimilado pela fotossíntese encontra-se sob a forma de hidratos de carbono não estruturais (NSC – *non-structural carbohydrates*) (Martínez-Vilalta *et al.*, 2016). Os hidratos de carbono são macromoléculas fundamentais para o metabolismo das plantas, dado que além de constituírem elementos estruturais da biomassa, geram a energia necessária para as reações químicas biológicas e para a síntese de outros compostos orgânicos (Hartmann & Trumbore, 2016). Os NSC têm sido propostos como a base determinante da resistência das plantas face às alterações climáticas (Rosas *et al.*, 2013) e diferenciam-se em dois grupos: os açúcares solúveis (SS, *soluble sugars*) e o amido (Quentin *et al.*, 2015). Provenientes dos produtos primários da fotossíntese, estes compostos, são distribuídos entre os diferentes tecidos da planta e desempenham diversas funções tais como o transporte, crescimento, metabolismo (fotossíntese e respiração), defesa, osmoproteção, osmorregulação e podem ainda ser exportados para simbiontes ou parceiros ecológicos como as micorrizas ou microrganismos do solo (Hartmann & Trumbore, 2016; Hartmann *et al.*, 2018).

O conjunto dos NSC compreende (Tabela 1): os açúcares simples, definidos como monossacarídeos, dos quais fazem parte as pentoses (arabinose, xilose ou ribose) e as hexoses

(glucose, frutose e galactose); a classe dos dissacarídeos, formada entre outros compostos, pelo açúcar de transporte mais comum, a sacarose, que pode ser hidrolisada em hidratos de carbono menores ou convertida em amido; os oligossacarídeos (estaquiose ou rafinose), que são cadeias curtas de monossacarídeos e estão envolvidos no transporte no floema; os polissacarídeos, que representam cadeias longas de monossacarídeos e podem apresentar uma forma linear (amilose) ou uma estrutura ramificada (amilopectina). Estes dois últimos compostos constituem o hidrato de carbono mais comum – o amido. O amido é um composto osmoticamente inativo, o que permite que as plantas o acumulem em grandes quantidades nos seus tecidos (Hartmann & Trumbore, 2016).

Tabela 1 Classe e funções dos diversos exemplos de açúcares. Adaptado de *Hartmann & Trumbore* (2016).

Classe	Exemplos	Funções
Monossacarídeos		
5C	Arabinose, xilose, ribose	Metabolismo e osmólitos
6C	Glucose, frutose, galactose	
Dissacarídeos	Sacarose	Transporte
Oligossacarídeos	Estaquiose, rafinose	Transporte
Polissacarídeos	Amido	Armazenamento

1.4.1 As dinâmicas dos NSC na planta

O processo de assimilação de carbono envolve alguma complexidade, uma vez que compreende um conjunto de interações que são controladas por restrições fisiológicas, biogeoquímicas e ecológicas. Desta forma, a compreensão de como as plantas dispõem e remobilizam os compostos assimilados pela fotossíntese continua a ser pouco compreendida e com limitações na predição das respostas das plantas e dos ecossistemas relativamente às alterações climáticas (Dietze *et al.*, 2014; Hartmann *et al.*, 2018).

O processo de assimilação inicia-se nas folhas da planta, nomeadamente nos cloroplastos, e a acumulação e formação de reservas acontece nos vacúolos e plastídeos (Chapin *et al.*, 1990).

Durante o dia, os hidratos de carbono produzidos são particionados em sacarose e amido (Figura 3). A sacarose, principal hidrato de carbono transportável, é exportada através do floema para os diversos tecidos da planta, onde é usada para o consumo (crescimento, respiração e defesa), uso imediato (funções osmóticas), e pode ainda ser convertida em amido nestes tecidos. O amido produzido durante o dia é armazenado nos plastídeos das folhas. Este armazenamento origina o aumento da concentração de amido nestes tecidos durante o dia (Chapin *et al.*, 1990; Martínez-Vilalta *et al.*, 2016). No decorrer da noite, ocorre a degradação do amido em sacarose, diminuindo assim a concentração deste nas folhas. A sacarose é novamente exportada pelo floema até aos tecidos da planta onde é necessária, garantindo a realização dos processos de respiração e crescimento durante a noite (Cerasoli *et al.*, 2004; Chapin *et al.*, 1990; Dietze *et al.*, 2014). Relativamente à taxa de exportação, esta é determinada pela necessidade de compostos de carbono nos tecidos da planta (Chapin *et al.*, 1990). O armazenamento constitui um importante mecanismo fisiológico na medida em que forma um tampão contra os períodos de stresse como o da limitação de água (Martínez-Vilalta *et al.*, 2016), da assincronia entre a oferta e a procura de carbono (Sala *et al.*, 2012) e da recuperação do xilema e do carregamento do floema (Hartmann & Trumbore, 2016; Martínez-Vilalta *et al.*, 2016).

De acordo com Chapin *et al.* (1990), o armazenamento caracteriza-se em três classes: i) a acumulação, definida como o processo que ocorre quando o fornecimento de hidratos de carbono excede a procura de carbono conduzindo a um aumento da concentração destes compostos; ii) a formação de reservas, que envolve a síntese de compostos e que compete diretamente com o crescimento e defesa. As reservas podem ser mobilizadas no futuro para a manutenção das funções metabólicas bem como para a sobrevivência da planta no decorrer e após condições desfavoráveis (McDowell *et al.*, 2008; Ramirez *et al.*, 2015); iii) a reciclagem, descrita como o processo no qual os compostos que inicialmente foram utilizados para o crescimento e defesa são reaproveitados para suportar o crescimento futuro. Na ausência da reciclagem, os compostos seriam perdidos para o solo através de biomassa (ex., folhada) (Chapin *et al.*, 1990; Hartmann *et al.*, 2018).

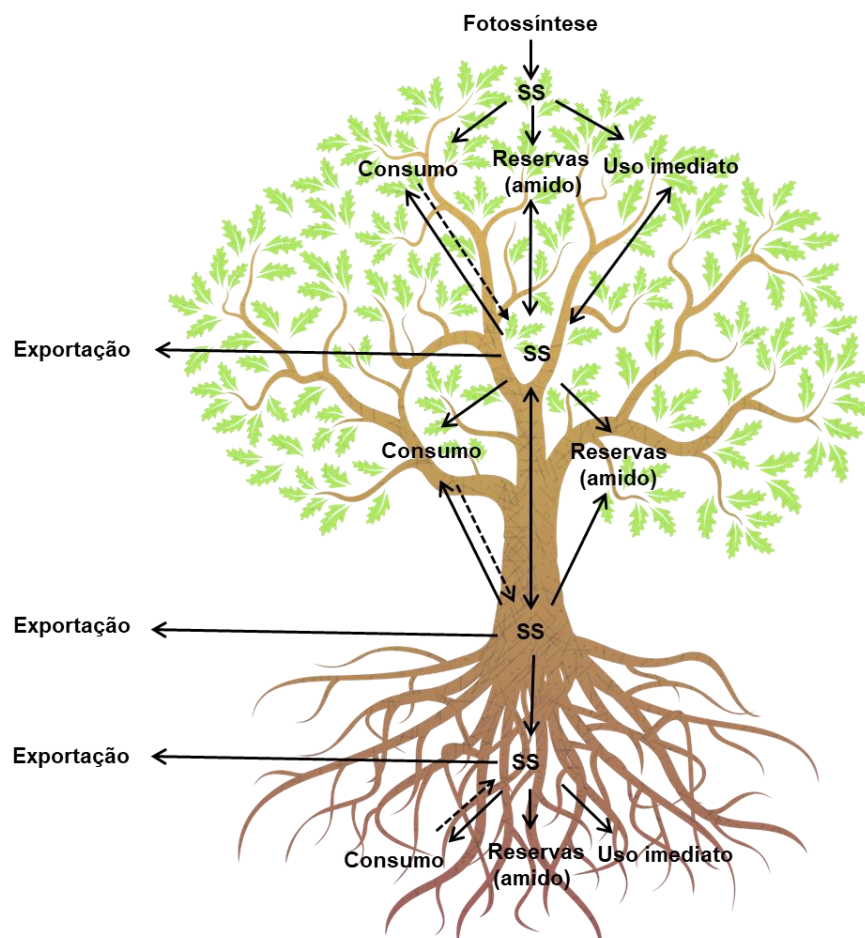


Figura 3 Diagrama representativo da distribuição e funções dos NSC nos diversos tecidos da planta. O SS (*soluble sugars*) são os açúcares solúveis. Adaptado de *Martínez-Vilalta et al.* (2016).

Neste contexto, o armazenamento pode ser definido como o balanço entre a oferta (fotossíntese) e a procura (crescimento e respiração) de carbono, mais conhecido pelo conceito de fonte-sumidouro (*source-sink*) (Martínez-Vilalta *et al.*, 2016). A oferta e a procura nem sempre se encontram sincronizadas, podendo provocar alterações no armazenamento dos NSC (Chapin *et al.*, 1990; Hartmann *et al.*, 2018; Sala *et al.*, 2012). As alterações são caracterizadas por flutuações das concentrações de NSC nos tecidos da planta em resposta a fatores abióticos (água e nutrientes disponíveis, temperatura e a química do solo) e bióticos (competidores herbívoros e doenças). Estas flutuações ocorrem em diversas escalas temporais, isto é, durante o dia e no decorrer dos períodos sazonais (Chapin *et al.*, 1990; Hartmann *et al.*, 2018; Sala *et al.*, 2012).

Durante o dia, a concentração de NSC aumenta em condições de céu limpo comparativamente a tempo nublado. Como já referido, durante o dia a ocorrência da fotossíntese aumenta as concentrações dos NSC. No decorrer da noite, estas concentrações diminuem (Chapin *et al.*, 1990). A nível sazonal, as concentrações de NSC dependem da fenologia da planta, isto é, da

produção de novas folhas e senescência de folhas velhas, da duração e quantidade da produção de semente e do início e fim da formação do lenho. As diferentes condições ambientais das estações, com variações de temperatura e precipitação, também contribuem para estas flutuações (Hartmann & Trumbore, 2016; Hartmann *et al.*, 2018; Rosas *et al.*, 2013;). Por exemplo, durante o inverno, o consumo de NSC é baixo nos ecossistemas de clima temperado e boreal. Nas regiões mediterrâneas, onde o período de dormência ocorre no inverno e o crescimento cessa durante os períodos mais quentes e secos, estas concentrações variam substancialmente (Hartmann *et al.*, 2018).

Neste contexto, a quantificação e a distribuição dos NSC nos diversos tecidos das plantas podem contribuir para uma melhor compreensão do comportamento tanto diário como sazonal das diferentes espécies (Raessler, 2011). Uma grande variedade de trabalhos têm sido realizados com vista a compreender as dinâmicas dos NSC em diferentes espécies florestais, nomeadamente em situações de seca, tanto induzida (por exemplo, Rosas *et al.* 2013), como em condições de campo naturais (por exemplo, Dietrich *et al.*, 2018). De igual modo, é de referir outros estudos, em que analisaram as respostas fisiológicas (potencial hídrico foliar e trocas gasosas) e os NSC em períodos de seca (por exemplo, Vaz *et al.*, 2010, 2011). Nestes estudos, quantificaram-se em determinados períodos os NSC em diferentes tecidos das plantas (folhas, ramos e raízes), e verificou-se uma variação temporal nos tecidos, sem a ocorrência do esgotamento das reservas.

Esta tese contribui para o estado de arte, pois existem poucos estudos, de que tenha conhecimento, sobre a dinâmica dos NSC no sobreiro (Cerasoli *et al.*, 2004; Faria *et al.* 1996; Vaz *et al.* 2010) e na esteva (Guimarães *et al.*, 2009). Na perspetiva das dinâmicas dos NSC, ainda é importante ressaltar que não foram encontrados nenhuns estudos relativamente à competição entre as duas espécies.

O aumento dos episódios de seca, em consequência das alterações climáticas podem prejudicar drasticamente os ecossistemas florestais quer a nível do balanço hídrico quer nas dinâmicas do ciclo de carbono, podendo inclusivamente causar a mortalidade das árvores através da falha hidráulica e da carência de carbono. O armazenamento de carbono torna-se importante para a manutenção das funções vitais e sobrevivência das árvores durante esses períodos.

O objetivo principal do presente trabalho é estudar o efeito da seca na dinâmica temporal dos NSC nas folhas e ramos do sobreiro e na esteva. Será também estudado o efeito da interação entre a seca e a invasão pela esteva no funcionamento e na resiliência dos sobreiros, nomeadamente as adaptações do sobreiro face aos stresses a que estão sujeitos.

Para este efeito, procedeu-se à recolha de tecidos (folhas e ramos) para a identificação e quantificação dos açúcares solúveis (glucose, sacarose e frutose) e amido em ambas as espécies. Neste trabalho, também se procedeu ao estudo dos parâmetros fisiológicos, nomeadamente, o potencial hídrico foliar e trocas gasosas das espécies, com vista a relacionar todos os parâmetros e a compreender as suas respostas aos tratamentos (ambiente/ seca induzida e invasão/ não invasão pela esteva) a que estão sujeitas.

2 Material e Métodos

2.1 Sítio experimental

O estudo foi realizado num montado de sobre localizado na Tapada Real de Vila Viçosa, a sudeste de Portugal (38°47'N, 7°22'W) numa propriedade murada com cerca de 900 ha. O sítio experimental encontra-se invadido por um sub-bosque monoespecífico do arbusto nativo, a esteva (*Cistus ladanifer* L.). Os sobreiros têm aproximadamente 50 anos de idade, com uma densidade de 160 ± 18.6 árvores/ha (média \pm erro padrão para todos resultados apresentados) e uma altura de 6.6 ± 0.5 m. O esteval tem aproximadamente 15 anos com 2-3 m de altura e uma densidade de 21667 ± 2602 arbustos/ha. O clima é tipicamente mediterrânico com uma temperatura média anual de 15.9°C. A precipitação média anual é 585 mm, ocorrendo maioritariamente no inverno (IPMA, 2020). O solo, classificado como leptossolo háplico (IUSS Working Group WRB, 2006), é pouco desenvolvido, pouco profundo (0.4 m) e com uma elevada proporção de cascalho derivado de xisto.

Em janeiro de 2018, foram instaladas de forma aleatória 12 parcelas de 25 x 25 m, organizadas em três blocos (quatro parcelas por bloco). Cada parcela corresponde a um determinado tratamento: montado sem esteva, sujeito à precipitação corrente (“ambiente”) (AQ, *Ambient* + *Quercus*), montado com esteva em “ambiente” (AQC, *Ambient* + *Quercus* + *Cistus*), montado sem esteva e com exclusão de chuva (DQ, *Drought* + *Quercus*) e montado com esteva e com exclusão de chuva (DQC, *Drought* + *Quercus* + *Cistus*) (Figura 4). Os blocos em estudo encontram-se vedados de forma a evitar a influência da fauna de grande porte, como: *Sus scrofa* (javali), *Cervus elaphus* (veados) e *Dama dama* (gamos). A exclusão de chuva foi estabelecida através da colocação de calhas de PVC rígido com 12.5 cm de largura ao longo das parcelas, de forma a cobrir 45% da área das parcelas, sendo a água canalizada para o exterior das parcelas tirando proveito do ligeiro declive do terreno. Para o estudo foram selecionados aleatoriamente três indivíduos de cada espécie por parcela (no total 36 sobreiros e 18 estevas), que foram monitorizados ao longo do estudo. As medições e a recolha de amostras foram realizadas durante o ano hidrológico de 2018/2019 (compreendido entre 1 de outubro de 2018 e 30 de setembro de 2019). Os dias de medições e amostragem foram sempre realizados com céu limpo e condições meteorológicas estáveis.



Figura 4 Parcelas com os diferentes tratamentos. a) AQ (*Ambient + Quercus*), b) AQC (*Ambient + Quercus + Cistus*), c) DQ (*Drought + Quercus*) e d) DQC (*Drought + Quercus + Cistus*).

2.2 Dados meteorológicos e teor de água do solo

Os dados meteorológicos, nomeadamente a precipitação, temperatura do ar (T_{ar}) e humidade relativa (HR) foram medidos continuamente e armazenados a cada meia hora numa estação meteorológica (DL2e, Delta-T Devices, Reino Unido) e Hobo USB Micro Station (H21-USB, Onset, EUA), instaladas em cada um dos três blocos (Figura 5). O déficit de pressão de vapor

(DPV) foi calculado a cada meia hora com os valores da T_{ar} e HR. O teor de água no solo (SWC, *Soil Water Content*) foi medido continuamente com sondas 5TM (METER Group, Inc. USA, EUA) em três profundidades (0.05, 0.20 e 0.40 m), em 12 perfis (um por parcela) e os dados armazenados a cada meia hora em *data loggers* (CR1000 e AM16/32 multiplexer, Campbell Scientific, EUA). Os valores obtidos representam as médias diárias. No caso do teor de água do solo, as médias diárias dizem respeito aos quatro tratamentos dos três blocos. Devido à falha dos sensores, desde a primeira quinzena de agosto até à amostragem de setembro a parcela AQ, do bloco 1 não registou medições.

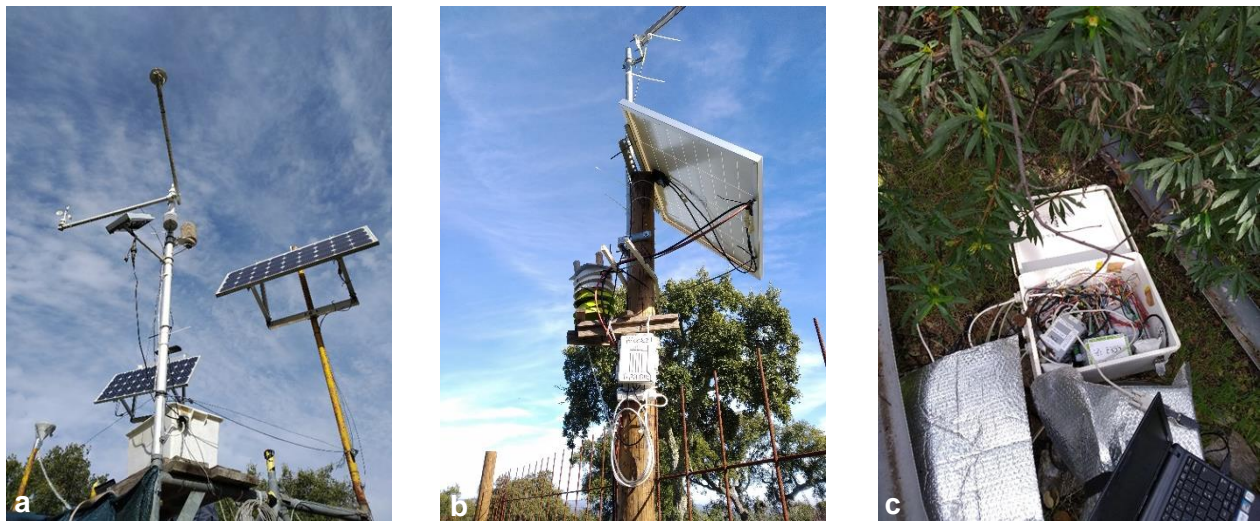


Figura 5 Estação meteorológica do bloco 1 (a), estação meteorológica do bloco 2 e 3 (b) e *data logger* onde são armazenados os dados medidos pelas sondas de humidade do solo (c).

2.3 Medições fisiológicas

Com o objetivo de determinar o estado hídrico e as respostas fisiológicas das plantas, foram medidos o potencial hídrico foliar e as trocas gasosas nas folhas dos indivíduos selecionados das duas espécies. O potencial hídrico foliar (Ψ) foi medido antes do nascer do sol (Ψ_{pd} , *predawn*) e ao meio dia solar (Ψ_{md} , *midday*) com uma câmara de pressão do tipo Scholander (PMS 1000, PMS Instruments, EUA). O Ψ_{pd} indica o estado hídrico da planta e a água disponível no solo para a espécie medida, enquanto que o Ψ_{md} , por ser medido à hora de maior radiação e temperatura, na qual a demanda evaporativa é maior, representa o valor mínimo diário do potencial de água e é indicativo da proximidade do xilema ao limiar hidráulico da cavitação (Ψ_{50}) (Choat *et al.*, 2012). O Ψ_{50} - valor correspondente à perda de 50% da condutividade hidráulica - do sobreiro e esteva

é de -2.9 MPa e -6.2 MPa, respetivamente (Pinto *et al.*, 2012; Quero *et al.*, 2011). A margem de segurança hidráulica foi calculada pela diferença entre Ψ_{md} e Ψ_{50} (Choat *et al.*, 2012). Esta margem, ao apresentar valores próximos de zero (ou mesmo negativos), indica que a planta já ultrapassou o valor de Ψ_{50} , e se encontra muito provavelmente com extensos embolismos e, portanto, com um grande risco de falha hidráulica (Choat *et al.*, 2012). No decorrer do ano hidrológico foram realizadas sete campanhas de medições: 9 e 25 de outubro, 13 de novembro de 2018, 27 de março, 12 de junho, 23 de julho e 25 de setembro de 2019. Devido às condições meteorológicas as medições do Ψ_{md} de novembro não foram realizadas.

As trocas gasosas, isto é, a taxa líquida de assimilação de CO₂ (A) e a condutância estomática (g_s), foram medidas ao longo do dia (manhã, meio-dia solar e tarde, respetivamente 10-12, 13-15 e 16-18 horas) com um medidor portátil de fotossíntese (LI-6400XT, LI-COR Inc., EUA), acoplado a uma fonte de luz e a um misturador de CO₂. Neste estudo, a intensidade da luz foi definida para 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (considerada saturante para a fotossíntese) e a concentração de CO₂ para os 400 ppm. A humidade relativa e a temperatura da folha seguiram os valores ambientais. Neste estudo, os valores apresentados de A e g_s referem-se às medições do meio do dia, sendo referidas como A_{13h} e g_{s13h} respetivamente. Os valores da taxa máxima de assimilação de CO₂ (A_{max}) e da condutância estomática à qual a taxa de assimilação é máxima (g_{smax}) também são apresentados e referem-se ao valor máximo registado das três medições do dia de amostragem. No decorrer do ano hidrológico foram realizadas quatro medições: 9 de outubro de 2018, 27 de março, 12 de junho e 24 de julho de 2019. Devido às condições meteorológicas, as medições de A_{13h} e g_{s13h} no mês de outubro não foram realizadas. Para ambas as medições, foram recolhidos 1-2 ramos por indivíduo, orientados a sul e expostos ao sol (exceto para o Ψ_{pd}), dos quais foram medidas 1-2 folhas. Para a medição do Ψ_{pd} e Ψ_{md} , as amostras foram colocadas imediatamente em sacos de plástico após o corte, de forma prevenir a transpiração dos ramos destacados.

2.4 Determinação dos NSC

Para o estudo dos NSC foram recolhidas amostras dos tecidos vegetais, nomeadamente folhas e ramos, dos mesmos ramos das medições fisiológicas. De forma a diminuir a variabilidade diária, os tecidos foram recolhidos sempre ao meio-dia solar (13h-15h). Foram retiradas aproximadamente 40 folhas completamente expandidas, sem danos visíveis provocados por

agentes bióticos, bem como 2 a 3 secções de ramos com aproximadamente 10 cm de comprimento. As amostras recolhidas foram imediatamente colocadas em envelopes de papel devidamente identificados com o código do indivíduo correspondente, mantidas numa arca refrigeradora com gelo e transportadas para laboratório. As recolhas de amostras dos tecidos vegetais para a avaliação dos NSC foram realizadas a 9 de outubro de 2018, 27 de março, 12 de junho e 23 de julho de 2019.

Em laboratório todas as amostras foram colocadas num micro-ondas durante 90 segundos a potência média, com vista a interromper a atividade enzimática e de seguida colocadas em estufa a 65°C durante 72 horas (Rosas *et al.*, 2013). Ambos os tecidos foram reduzidos a pó fino (Rosas *et al.*, 2013) com um moinho de esferas (MM2000, Retsch, Alemanha). As folhas foram previamente desfeitas à mão e moídas durante 3 minutos com amplitude de 80°. Nos ramos foi retirada a parte do borne para a trituração durante 2 minutos com amplitude de 90°. O pó resultante foi colocado em frascos devidamente identificados.

A determinação dos NSC decorreu em duas etapas: obtenção dos espectros do conjunto das amostras por espectrometria de infravermelho próximo (NIR, *near-infrared spectroscopy*) e análise de um subconjunto de amostras por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *high pressure liquid chromatography*) para calibração do modelo para estimação dos NSC por NIR. O NIR permite a análise de um grande número de amostras com elevada fiabilidade e com custos muito inferiores aos dos métodos de referência. Este método tem por base a interação entre a radiação eletromagnética e o material, através da absorção em intervalo de número de ondas dos 12000 aos 4000 cm^{-1} , no qual as bandas de absorção são o resultado dos sobretons e combinações de banda das vibrações fundamentais que ocorrem no infravermelho médio das ligações O-H, C-H, N-H e S-H (Rodrigues *et al.*, 1998). Os procedimentos de cada etapa serão explicados de seguida.

Para a leitura dos espectros, os frascos foram colocados abertos em estufa a 60°C durante a noite anterior à leitura. De manhã, os frascos foram fechados e colocados num exsiccador durante cerca de 30 min até atingirem a temperatura ambiente. Os espectros foram lidos num espectrómetro de infravermelho próximo (MPA, Bruker Optik, Alemanha) equipado com esfera de integração. Os espectros resultam da co-adição de 100 Scans (varrimentos) com uma resolução de 8 cm^{-1} , no comprimento de onda dos 12500 aos 4000 cm^{-1} . Para o tratamento da informação espectral foi utilizado o software OPUS 6.5.

Da totalidade das amostras analisadas por NIR, foi selecionado um subconjunto para análise quantitativa dos NSC (37 amostras de esteva e 33 de sobreiro), de acordo com a metodologia descrita em Landhäusser et al., (2018). Do subconjunto, foram retirados 30 mg de peso seco de amostra para um *ependorf* (2 ml) devidamente identificado. Foram ainda adicionados mais quatro *ependorf*: dois de controlo, contendo um 30 mg de glucose e outro 30 mg de sacarose; dois de ensaio em branco, prescrevendo assim, 72 amostras. Os pesos das amostras contidas em cada *ependorf* foram registados (W). A cada *ependorf* foi adicionado 1.5 ml de solução etanol a 80% (volume do extrato, Vext.), seguidamente foram fechados e colocados no *thermomixer* (agitador com regulador de temperatura a 90°C e durante 10 minutos; Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Alemanha). Os *ependorf* foram arrefecidos à temperatura ambiente e centrifugados a 13.000 rpm (Scanspeed 1580R, LaboGene, Dinamarca) durante 1 minuto. Posteriormente, 1.0 ml do sobrenadante foi transferido e filtrado (Filterlab, filtros de seringa nylon 0.22µm, 13 mm) para novos *ependorf* e colocados em estufa a 60°C, durante 16 horas para evaporação do álcool. Com o objetivo de remover os açúcares residuais da amostra, foram efetuadas duas novas extrações, que consistiram na repetição dos passos anteriores. Após evaporação, a cada *ependorf* foi adicionado 1.0 ml de água destilada e foram guardados em frigorífico, a 2-8°C, para a determinação dos açúcares solúveis.

O restante sobrenadante foi removido, mantendo o *pellet* (precipitado) nos *ependorf* para determinação do amido. Para a digestão do amido, isto é, conversão do amido em glucose hidrolisada, foram previamente preparadas as seguintes soluções: (i) solução tampão de acetato de sódio (25 mM, pH 4.6) – dissolveu-se 1.025 g de acetato de sódio em 450 ml de água destilada. Ajustou-se o pH 4.6 com ácido acético; (ii) solução de α-amilase (600 unidades/mL): 72.9 mg da enzima de α-amilase (de *Bacillus licheniformis*, Sigma A4551) foram dissolvidos em 72 ml de água destilada (1 ml por amostra) com recurso ao agitador magnético (VMS-C10, VWR Collection, Portugal). A quantidade necessária foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Atividade enzimática (unidades/mg de pó)} = \frac{\text{unidades}}{\text{mg de proteína}} \times \left(\% \text{ de } \frac{\text{Proteína}}{100} \right) \times \left(\% \text{ de } \frac{\text{Pureza}}{100} \right)$$

(iii) solução de amiloglucosidade (12 unidades/mL): 108 mg da enzima amiloglucosidase (de *Aspergillus niger*, Roche #11202367001, Sigma RoamylII). Dissolveu-se esta quantidade de enzima em 36 ml da solução (i) (0.5 ml por amostra) com o agitador magnético. A quantidade necessária foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Atividade enzimática (unidades/mg de pó)} = \mu/\text{mgl}$$

A cada *ependorff*, foi adicionado 1.0 ml da solução (i). Com o propósito de misturar o sólido com a solução cada *ependorff* foi agitado no vortex (L24, Lambico B.V., Holanda). Os *ependorff* foram colocados no *thermomixer* a 85°C durante 30 minutos (ao fim dos primeiros 10 minutos os *ependorff* foram agitados, de forma a assegurar que a parte sólida se encontrava em suspensão). Após o arrefecimento, os *ependorff* foram novamente agitados e centrifugados a 13.000 rpm durante 1 minuto. Posteriormente, 0.1 ml do sobrenadante livre de qualquer resíduo sólido foi transferido para um novo *ependorff* (2 ml) e a estes foram adicionados 0.5 ml da solução (ii). Após nova agitação no vortex, foram colocados no *thermomixer* durante 30 minutos a 55°C. Após o arrefecimento, os *ependorff* foram agitados novamente no vortex. Para finalizar o processo de digestão, em cada solução da amostra, incluindo o ensaio em branco, foi adicionado 0.6 ml de clorofórmio (LiChrosolv, Merck KGaA, Alemanha) para precipitar as proteínas enzimáticas. As amostras foram agitadas no vortex e centrifugadas a 13.000 rpm durante 1 minuto e a fase aquosa (camada superior) foi transferida para um novo *ependorff* (2ml).

Os açúcares solúveis e a glucose hidrolisada foram quantificados por HPLC. HPLC é uma técnica que permite separar, identificar e quantificar as concentrações de cada componente de uma solução (Landhäusser *et al.*, 2018; Magwaza & Opara, 2015). A análise por este método foi realizada no Laboratório Associado para a Química Verde, REQUIMTE, localizado na Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT). Após a quantificação, para o cálculo das concentrações individuais das componentes dos açúcares solúveis e do amido foi aplicada a Equação 1 e Equação 2, respetivamente. O resultado foi expresso em percentagem de concentração do respetivo composto na amostra, por peso seco da amostra (w/w).

$$\text{(Equação 1)} \quad \% \text{ SS (w/w)} = \frac{([glucose] + [fructose] + [sacarose] \times \frac{360.3}{342.3}) \times V_{ext.}}{(W \times 10^3)} \times 100\%$$

$$\text{(Equação 2)} \quad \% \text{ Amido (w/w)} = \frac{([glucose \text{ hidrolisada}] \times V_{amido})}{(W \times 10^3)} \times 0.9 \times 100\%$$

Onde: [glucose], [frutose], [sacarose] é a concentração dos açúcares solúveis respetivos na solução da amostra, em µg/ml; Vext. é o volume extratado em ml (1.5 ml); W, é o peso inicial da amostra em mg; [glucose hidrolisada] é a concentração da glucose hidrolisada na solução após

a digestão do amido; Vamido, é o volume da amostra da digestão do amido (6ml). Os resultados das duas equações foram somados para obter a totalidade de NSC em cada amostra. Finalmente, com recurso a relações estatísticas entre os espectros obtidos pelo NIR e o subconjunto de dados obtidos pela análise por HPLC, foram calibrados modelos para predição dos SS, amido e NSC, na totalidade das amostras. Os modelos construídos e a calibração foram realizadas pelo Professor José Carlos Rodrigues no Instituto Superior de Agronomia. Uma vez que os modelos se encontram em fase de validação, com a análise quantitativa por HPLC de um novo subconjunto de amostras, os dados apresentados neste estudo devem ser considerados preliminares e interpretados com prudência.

2.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada separadamente para cada espécie. No sobreiro foi utilizado o modelo linear generalizado (GLM), no qual o bloco foi considerado como fator aleatório, a água (ambiente/ seca induzida) e a invasão (invasão/ não invasão pela esteva) como fatores fixos e a data como fator de medições repetidas, na medida em que os mesmos indivíduos foram repetidamente medidos ao longo do tempo. Na esteva foi igualmente utilizado o GLM, em que a água foi o fator fixo considerado, mantendo-se todos os outros fatores anteriormente mencionados. A realização de análises independentes de cada fator e a interação entre os mesmos permitiu identificar os efeitos significativos de cada um dos fatores. Posteriormente, para a análise das diferenças significativas entre tratamentos em cada data de amostragem foram realizadas análises pelo teste ANOVA a um fator, ou o seu correspondente não paramétrico – teste de *Kruskal-Wallis* – quando os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias não foram cumpridos. A comparação múltipla de médias foi feita com o teste de *Tukey*. Para verificar a normalidade e homogeneidade das variâncias nos dados foram utilizados os testes de *Shapiro-Wilk* e/ou *Kolmogorov-Smirnov*, e teste de *Levene*, respetivamente. O nível de significância estabelecido foi de 5% ($\alpha = 0.05$). A existência de correlações foi analisada através do coeficiente de *correlação de Spearman*. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. Para a análise de dados foi utilizado o *software SPSS Statistics* versão 26 (IBM Corp., EUA).

3 Resultados

3.1 Dados meteorológicos e teor de água no solo

A temperatura média do ar foi de 16.4°C durante o período de estudo, sem grandes desvios relativamente ao período de referência (16.5°C; 1981-2010, Évora, IPMA 2020). A precipitação total foi de 389 mm, representando um decréscimo de 34% relativamente ao período de referência, tendo-se verificado um decréscimo em todas as estações de ano (Tabela 2). Entre as amostragens de outubro de 2018 (9 e 25 de outubro) ocorreu um total de 43.6 mm de precipitação. Durante a primavera, os últimos registos de precipitação ocorreram no mês de maio com um total de 8.14 mm (Figura 6 A), e em junho (6 de junho) ocorreu um pequeno evento de precipitação dias antes da amostragem (1.26 mm). O mesmo sucedeu em setembro (21 de setembro), mas com um maior volume de precipitação (11.7 mm).

Tabela 2 Médias da temperatura do ar (T_{ar}) e do total da precipitação (P) nas quatro estações do ano hidrológico de 2018/2019 e no período de referência, 1981-2010 (Évora, IPMA 2020). Δ representa a diferença percentual entre os valores registados durante o período de estudo e o período de referência.

<i>Estação</i>	T_{ar} (°C)	T_{ar} (1981-2010) (°C)	Δ (%)	P (mm)	P (1981-2010) (mm)	Δ (%)
Outono	12.9	13.9	-7	197	266.3	-26.0
Inverno	11.3	11.2	1	95	156.5	-39.3
Primavera	17.7	17.6	1	80.3	118	-31.9
Verão	23.6	23.3	1	16.2	44.5	-63.6
Média/Total	16.4	16.5	-1	388.5	585.3	-33.6

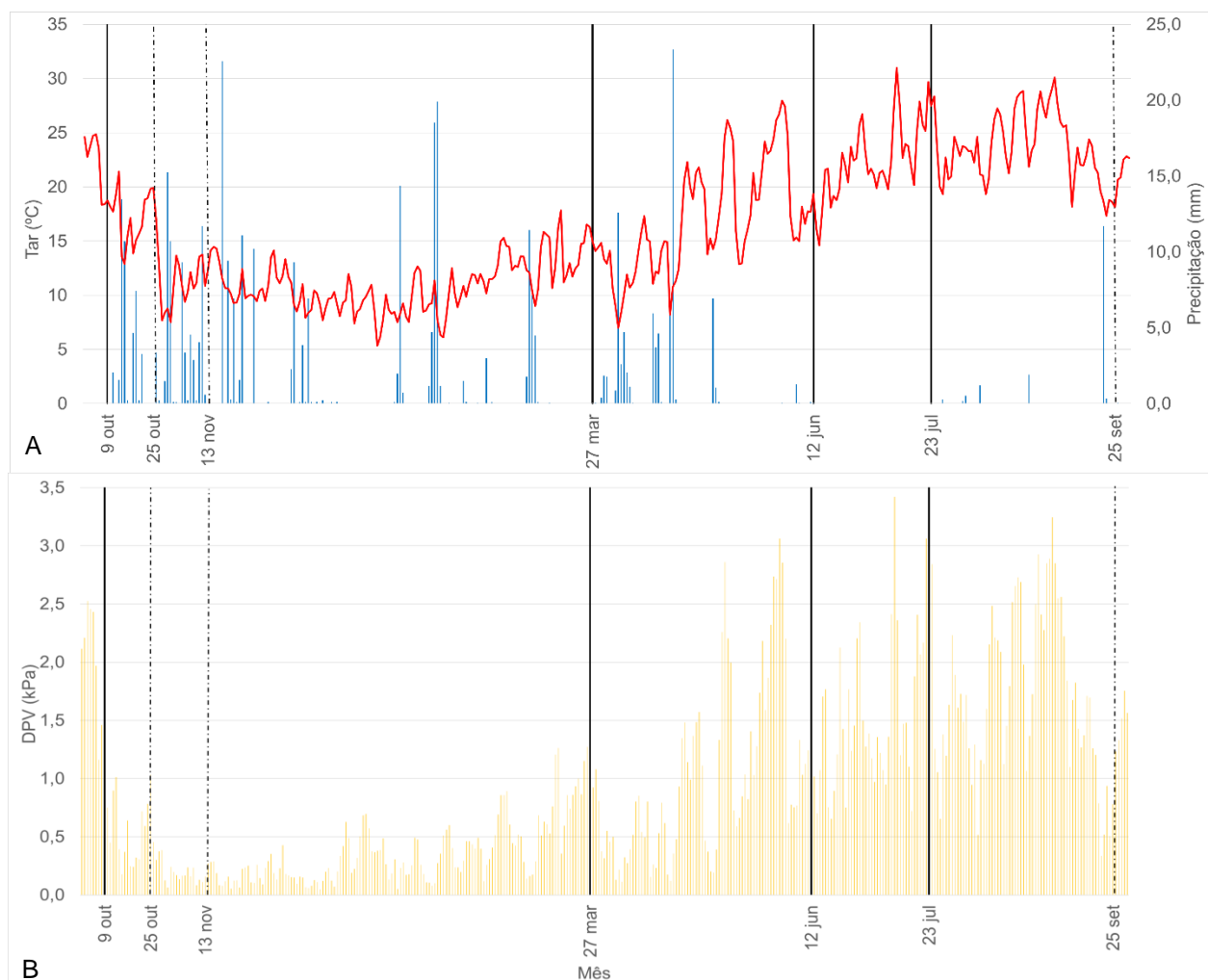


Figura 6 Temperatura média do ar, precipitação (mm) (A) e déficit de vapor de água (kPa) (B) nos três blocos, durante o ano hidrológico. As linhas contínuas pretas correspondem aos dias de amostragem de Ψ , trocas gasosas e NSC durante o estudo. As linhas a tracejado correspondem aos dias adicionais de amostragem dos Ψ .

Em resultado da diminuição da precipitação após o outono, ocorreu um decréscimo na disponibilidade de água no solo nas três profundidades ao longo do tempo (Figura 7). Os eventos de precipitação podem ser verificados pelos picos dos gráficos. A partir de maio, a profundidade 0.05 m apresentou teores de água inferiores às restantes profundidades. Quando analisadas as datas de amostragem, o teor de água do solo à profundidade de 0.05 m foi significativamente inferior nas parcelas não invadidas ($p = 0.011$) (Tabela Anexo 1 - A1). O mesmo sucedeu na profundidade 0.40 m ($p = 0.007$). Nas profundidades de 0.20 e 0.40 m observou-se uma interação significativa água*invasão ($p = 0.001$), o que se traduziu em diferenças significativas em novembro na profundidade 0.40 m entre o tratamento DQ e o DQC ($p = 0.04$).

Na profundidade 0.20 m, entre a amostragem de março e junho, o tratamento AQ e DQ foram os que apresentaram um maior decréscimo (-4.5%), seguido pelo tratamento AQC (-3.9%). Os

tratamentos AQC e DQ, apresentam maiores valores na profundidade 0.20 m, enquanto que na profundidade 0.40 m estes são menores comparativamente aos restantes tratamentos. A precipitação ocorrida a 21 de setembro (11.7 mm) apenas foi notória na profundidade 0.05 m, uma vez que não foi suficiente para se infiltrar em profundidade.

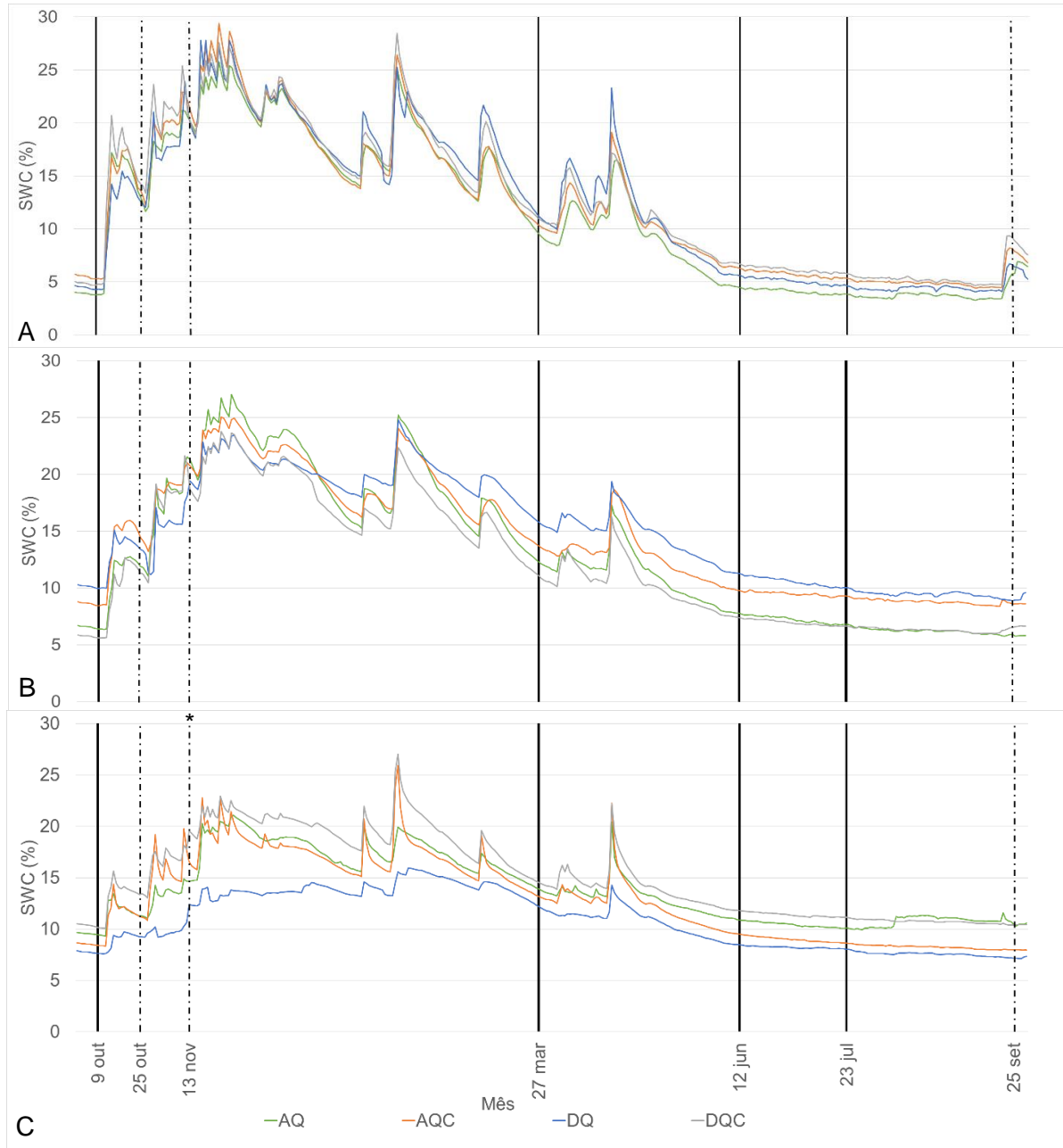


Figura 7 Média diária do teor de água no solo para os quatro tratamentos (AQ; AQC; DQ; DQC) nas três profundidades diferentes (A = 0.05 m; B = 0.20 m; C = 0.40 m). As linhas pretas correspondem aos dias de amostragem de Ψ , trocas gasosas e NSC durante o estudo. As linhas a tracejado correspondem aos dias adicionais de amostragem dos Ψ . O asterisco indica diferenças significativas ($p < 0.05$).

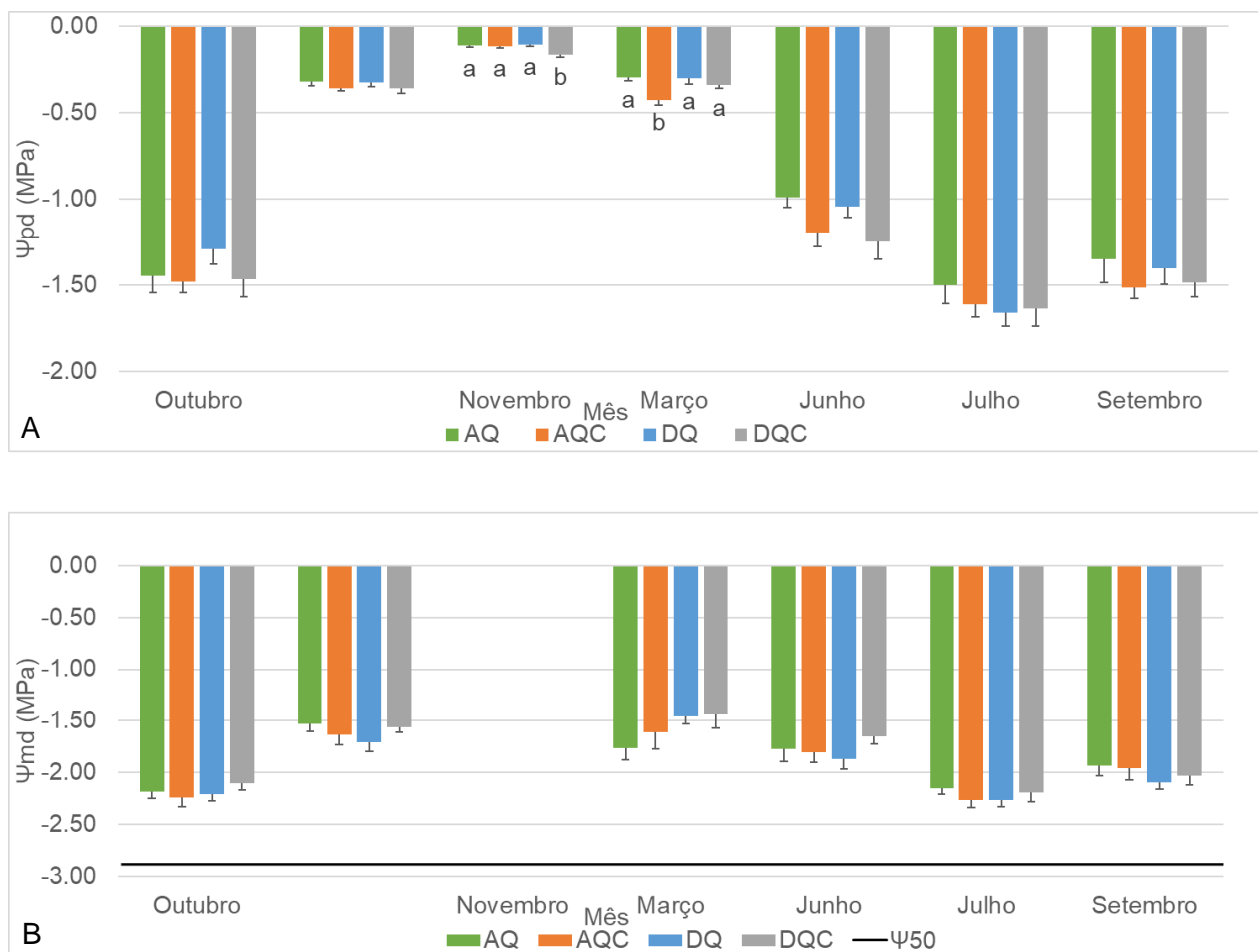
3.2 Medições fisiológicas

3.2.1 Potencial hídrico foliar

O potencial hídrico foliar de madrugada, Ψ_{pd} , variou de forma semelhante em ambas as espécies ao longo do ano hidrológico (Figura 8 A e C). Em resultado da precipitação ocorrida entre as duas medições de outubro de 2018 (Figura 6), que conduziu ao aumento da disponibilidade de água no solo (Figura 7), verificou-se uma recuperação do Ψ_{pd} nas duas espécies. O Ψ_{pd} manteve-se elevado (menos negativo) entre o meio do outono até ao início da primavera, diminuindo significativamente de seguida com o decréscimo da água no solo e com o aumento da temperatura. No sobreiro, o valor mínimo de Ψ_{pd} foi observado em julho (-1.50 ± 0.11 MPa – AQ; -1.61 ± 0.07 MPa – AQC; -1.66 ± 0.08 MPa – DQ; -1.64 ± 0.10 MPa – DQC). Na esteva, os valores de Ψ_{pd} do mês de julho também foram uns dos mais negativos do ano hidrológico (-3.39 ± 0.06 MPa – AQC; -3.47 ± 0.05 MPa – DQC). Em setembro de 2019 observou-se uma ligeira recuperação do Ψ_{pd} , principalmente na esteva, em resposta à precipitação ocorrida no final do verão. No sobreiro, entre outubro e julho, as datas foram todas significativamente diferentes umas das outras. Na esteva, as datas foram todas significativamente diferentes. A presença da esteva (invasão) teve um efeito significativo no Ψ_{pd} do sobreiro (Figura 8 A; Tabela A1). Os sobreiros dos tratamentos de invasão apresentaram valores de Ψ_{pd} inferiores aos dos tratamentos não invadidos, exceto em julho. Também se observou uma interação significativa água*invasão, que se traduziu em diferenças significativas entre tratamentos em novembro e março. No mês de novembro, o Ψ_{pd} dos sobreiros do tratamento DQC foi significativamente inferior ao dos restantes tratamentos ($p < 0.01$). No mês de março, o Ψ_{pd} no tratamento AQC foi significativamente inferior ao dos restantes tratamentos ($p < 0.01$). Na esteva, a seca induzida (água) não teve efeito no Ψ_{pd} (Figura 9 B, Tabela A2).

O potencial hídrico foliar do meio dia, Ψ_{md} , de ambas as espécies exibiu um padrão semelhante ao do Ψ_{pd} (Figura 8 B e D). Entre o meio do outono até ao início da primavera, o Ψ_{md} manteve-se elevado, diminuindo posteriormente. No mês de julho foram observados os valores mínimos de Ψ_{md} no sobreiro (-2.15 ± 0.06 MPa – AQ; -2.26 ± 0.07 MPa – AQC e DQ; -2.19 ± 0.09 MPa – DQC) e na esteva (-5.34 ± 0.13 MPa – AQC e -5.49 ± 0.13 MPa – DQC). Ambas as espécies nunca ultrapassaram as margens de segurança hidráulica, e embora a primeira data de outubro e a de julho se encontrem mais próximas do Ψ_{50} , estas datas não exibiram diferenças significativas.

Na esteva, todas as datas foram significativamente diferentes. A presença da esteva (invasão) teve um efeito significativo no Ψ_{md} do sobreiro (Figura 8 B; Tabela A1). Também se observou uma interação significativa água*invasão, que embora não tenha sido significativa entre tratamentos, é relevante destacar a variação entre o tratamento DQC (-1.43 \pm 0.14 MPa) e o tratamento AQ (-1.76 \pm 0.11 MPa) no mês de março. Na esteva, a seca induzida (água) não teve efeito no Ψ_{md} (Figura 8 D; Tabela A2). No entanto, quando analisadas as datas separadamente, a esteva apresentou diferenças significativas no mês de março entre tratamentos ($p < 0.01$). A esteva apresentou sempre valores de Ψ mais negativos que o sobreiro.



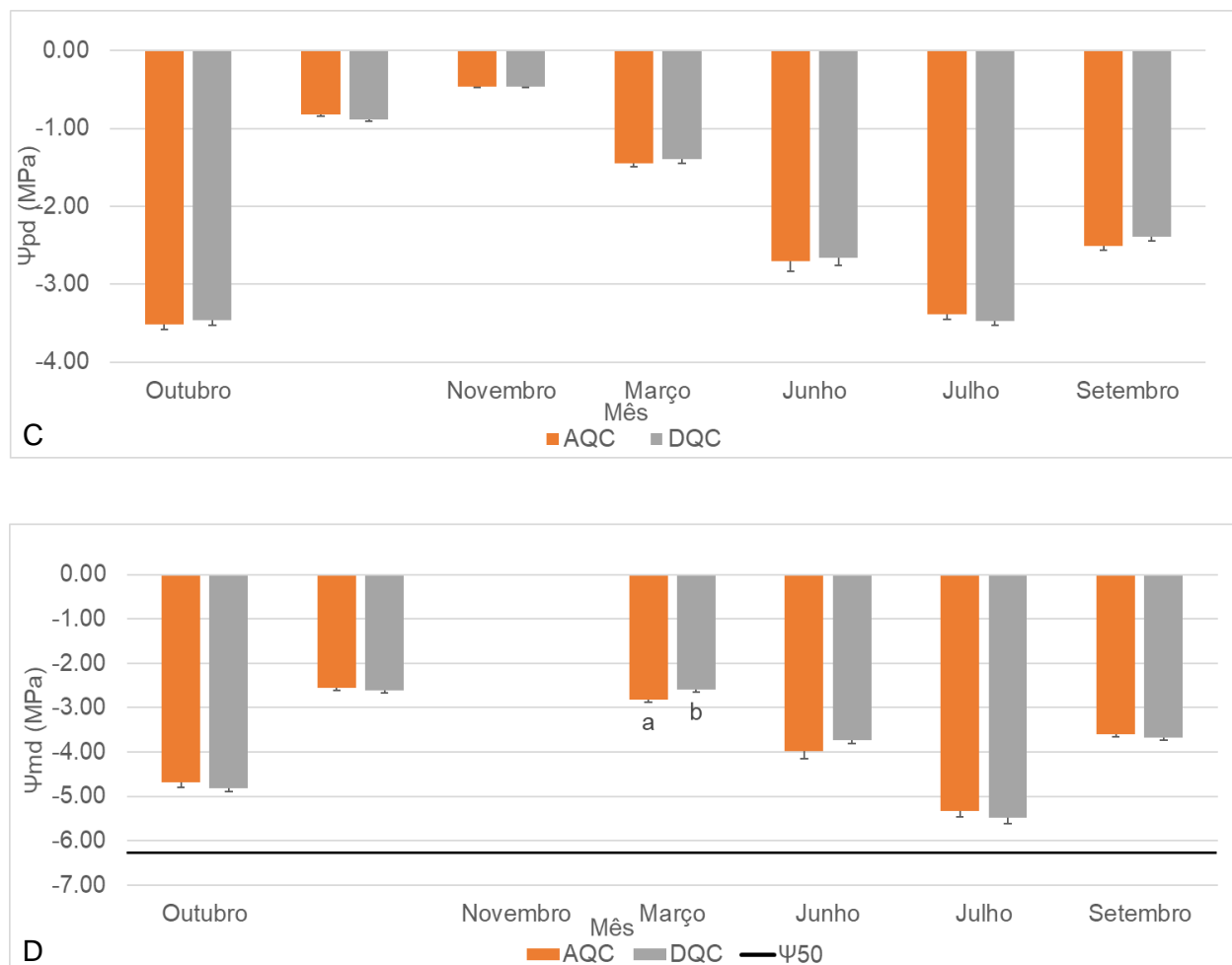


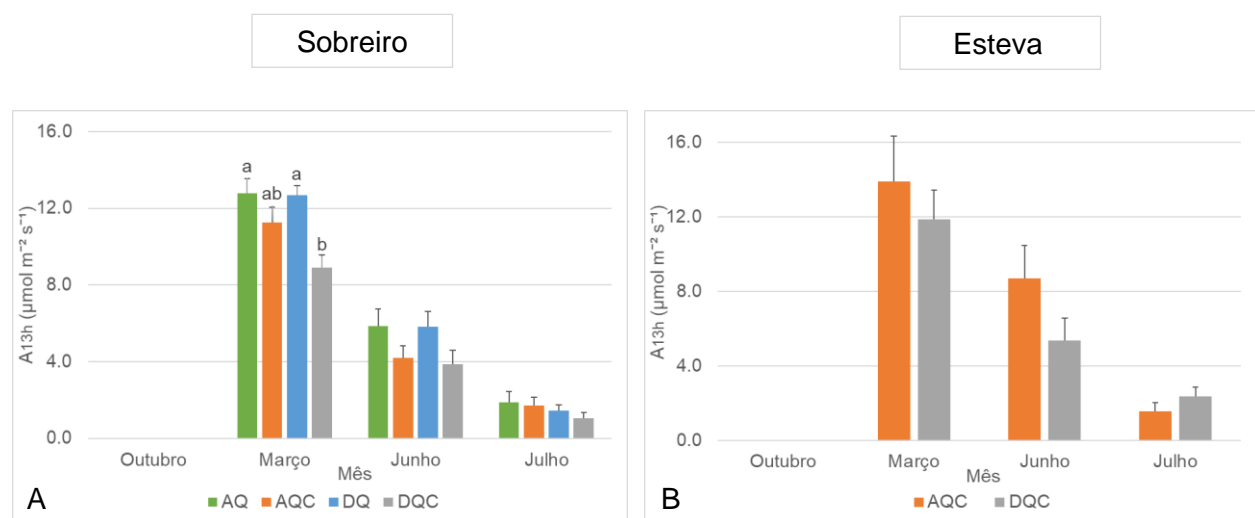
Figura 8 Potencial hídrico de madrugada, Ψ_{pd} e potencial hídrico do meio do dia, Ψ_{md} para os indivíduos de sobreiro (A e B) e esteva (C e D) nos diferentes tratamentos. A linha preta, Ψ_{50} , refere-se à margem de segurança hidráulica do sobreiro (-2.9 MPa) e da esteva (-6.2 MPa). Os valores representam a média \pm erro padrão dos quatro tratamentos ($n = 9$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0.05$). A ausência de letras deve-se a não ocorrer diferenças significativas. Note-se que as escalas dos gráficos diferem.

3.2.2 Trocas gasosas

Também nos parâmetros das trocas gasosas (A_{13h} , gs_{13h} , A_{max} e gs_{max}) é possível observar um padrão semelhante ao dos Ψ durante o período de amostragem (Figura 9). No início de outubro, quando o teor de água no solo ainda era muito baixo e o Ψ_{pd} muito negativo, as trocas gasosas estavam relativamente inibidas, principalmente na esteva. As trocas gasosas atingiram os valores mais elevados no mês de março nas duas espécies, diminuindo drasticamente nas medições seguintes, atingindo os valores mínimos em julho. O decréscimo da A_{13h} , foi mais significativo na

esteve do tratamento AQC, verificando-se a maior diferença entre o mês de junho e julho (de $8.69 \pm 1.77 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para $1.56 \pm 0.46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

A presença de esteva (invasão) e a seca induzida (água) tiveram um efeito significativo em todos os parâmetros das trocas gasosas do sobreiro (Figura 9 A, C, E, F; Tabela A1). Os sobreiros dos tratamentos de invasão apresentaram valores inferiores em todos os parâmetros aos dos tratamentos não invadidos, exceto em outubro na A_{max} e g_{smax} , e em julho na A_{13h} . Os sobreiros dos tratamentos de seca induzida apresentaram valores superiores de A_{max} e g_{smax} no mês de outubro, e valores inferiores de A_{13h} no mês de julho comparativamente aos dos tratamentos de ambiente. Também foi possível verificar uma interação significativa água*invasão em todos os parâmetros, que se refletiu em diferenças significativas entre tratamentos em março e junho. No mês de março, a A_{13h} dos sobreiros do tratamento DQC foi significativamente inferior aos tratamentos AQ e DQ ($p = 0.001$). No mês de junho, a A_{max} dos sobreiros do tratamento DQC foi significativamente inferior aos tratamentos AQ e DQ ($p < 0.01$). Neste mesmo mês, a g_{smax} do tratamento AQC foi significativamente inferior ao tratamento DQ ($p < 0.05$), e o tratamento DQC foi significativamente inferior ao tratamento AQ e DQ ($p < 0.01$). Embora não apresente diferenças significativas entre tratamentos, é de destacar a variação da $g_{\text{s}13h}$ entre o tratamento DQC ($0.12 \pm 0.02 \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e o tratamento AQ ($0.20 \pm 0.02 \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no mês de março. Na esteva, a seca induzida teve efeito em todos os parâmetros, exceto na A_{max} . No mês de março, a $g_{\text{s}13h}$ das estevas do tratamento DQC foi significativamente inferior ao AQC ($p < 0.05$). No mês de junho, a esteva apresentou sempre valores superiores nos parâmetros de $g_{\text{s}13h}$, A_{max} e g_{smax} comparativamente ao sobreiro.



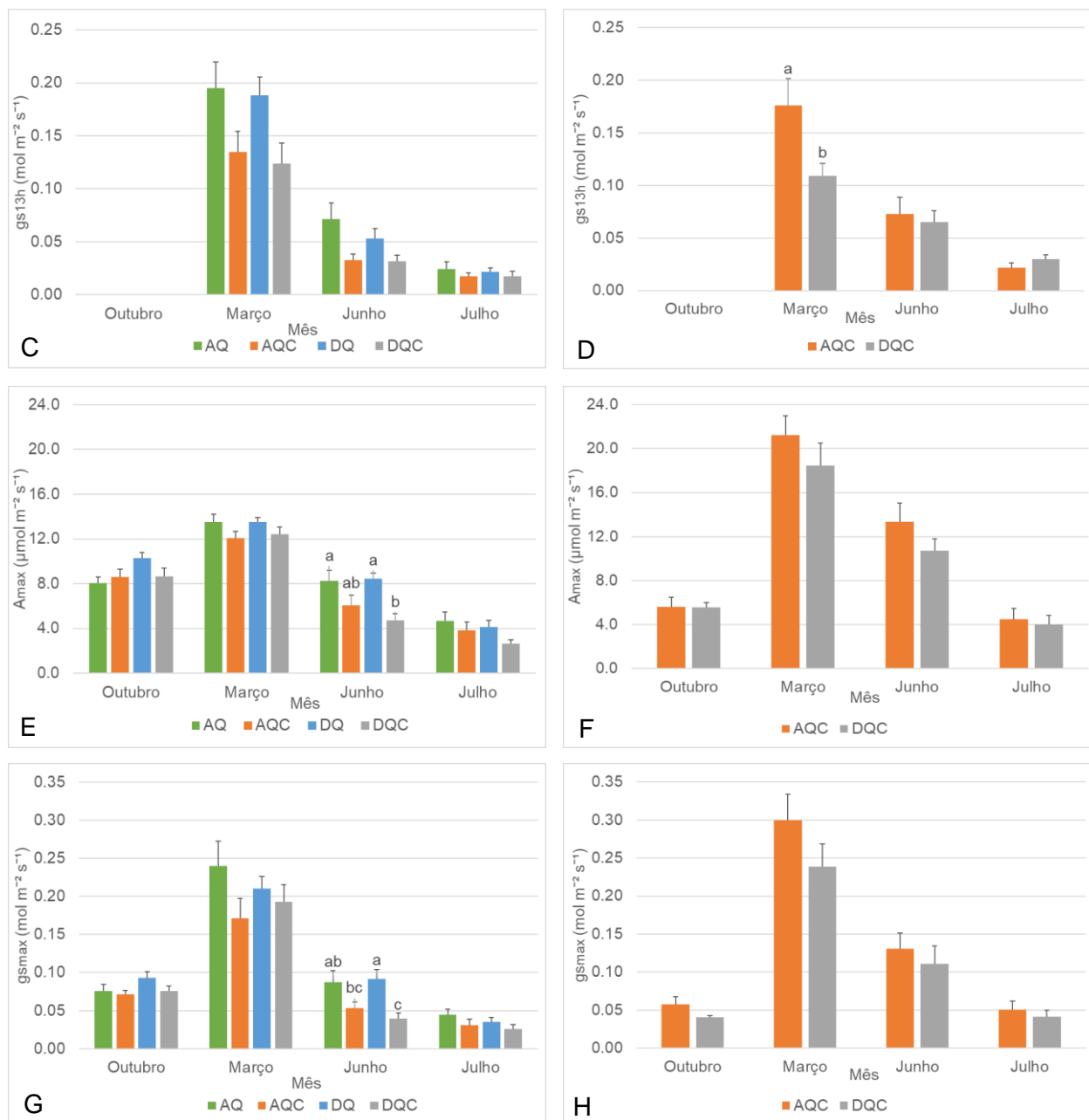


Figura 9 Taxa de assimilação (A_{13h}), condutância estomática (gs_{13h}), taxa máxima de assimilação (A_{max}) e condutância estomática máxima (gs_{max}) para o sobreiro (esquerda) e esteva (direita) nos diferentes tratamentos. Os valores representam a média \pm erro padrão dos indivíduos nos quatro tratamentos ($n = 9$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0.05$).

Verificou-se uma relação positiva e forte entre a A_{13h} e gs_{13h} ($r = 0.94$ e $p < 0.001$ no sobreiro e $r = 0.88$ e $p < 0.001$ na esteva), e A_{max} e gs_{max} ($r = 0.96$ e $p < 0.001$ no sobreiro e $r = 0.93$ e $p < 0.001$ na esteva). Embora tenha ocorrido um decréscimo mais acentuado de gs_{max} em relação a A_{max} entre março e junho, é de referir que a relação entre os mesmos foi positiva e forte, tanto

para o sobreiro como para a esteva ($r = 0.96$ e $p < 0.001$ e $r = 0.83$ e $p < 0.001$, respectivamente). Igualmente, o aumento de gs_{13h} está fortemente correlacionado com o aumento de Ψ_{pd} ($r = 0.83$ e $p < 0.001$ no sobreiro e $r = 0.79$ e $p < 0.001$ na esteva), uma vez que maiores disponibilidades de água permitem uma maior abertura estomática, como se pode verificar pela Figura 10. Por outro lado, pode observar-se um limiar no Ψ_{pd} para o encerramento dos estomas, ou seja, um valor a partir do qual a condutância estomática é fortemente inibida, sendo neste caso de aproximadamente -1.50 MPa e -3.00 MPa para o sobreiro e esteva, respectivamente.

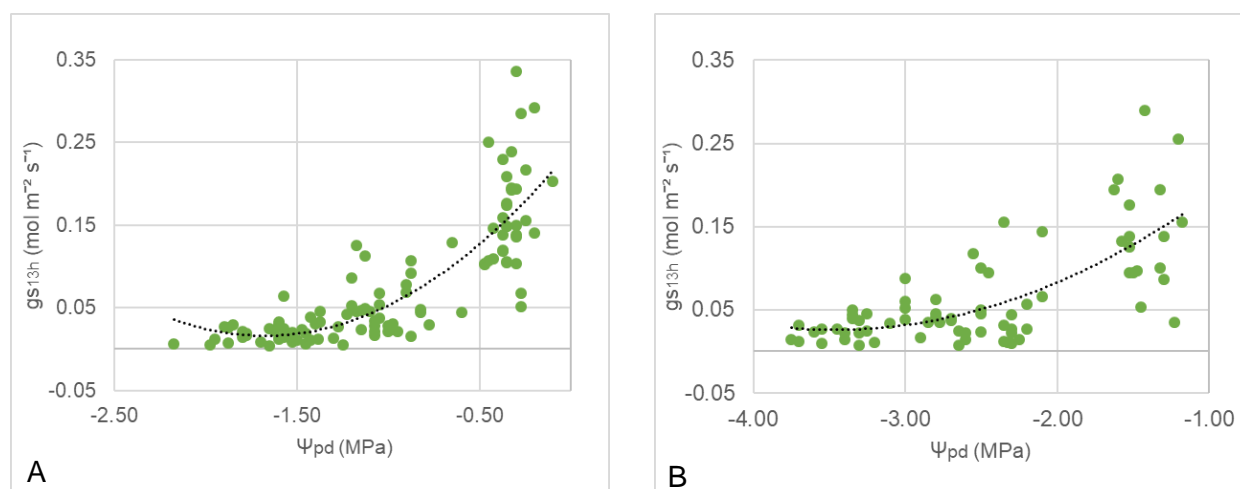


Figura 10 Relação entre a condutância estomática (gs_{13h}) ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e o Ψ_{pd} (MPa) durante o período de amostragem para o sobreiro (A) e esteva (B).

3.2.3 Hidratos de carbono não estruturais

Em ambas as espécies, as concentrações dos compostos de amido, SS e NSC nas folhas exibiram uma tendência sazonal (Figura 11 e Figura 12). As folhas do sobreiro, exibiram menores concentrações de amido, SS e NSC em outubro, aumentando significativamente durante a primavera, e diminuindo significativamente no mês de julho. As concentrações de SS nas folhas dos sobreiros foram superiores em junho ($5.18 \pm 0.24\%$ - AQ; $5.41 \pm 0.17\%$ - AQC; $5.31 \pm 0.28\%$ - DQ; $5.81 \pm 0.10\%$ - DQC). As folhas da esteva também apresentaram um padrão semelhante ao descrito, no entanto, as concentrações de SS e NSC mantiveram-se superiores durante o verão. A presença de esteva (invasão) e da seca induzida (água) tiveram um efeito significativo nas concentrações de amido e NSC nas folhas de sobreiro (Figura 11 A e E; Tabela A1). As folhas dos sobreiros dos tratamentos de invasão apresentaram concentrações superiores de amido no mês de março e julho, e concentrações de NSC superiores no mês de março e junho comparativamente aos tratamentos não invadidos. As folhas dos sobreiros dos tratamentos de

seca induzida exibiram concentrações de NSC superiores no mês de outubro comparativamente aos tratamentos de ambiente. Também se observou uma interação significativa água*invasão nas concentrações de SS das folhas. Na esteva, a seca induzida teve efeito nas concentrações de SS e NSC das folhas (Figura 12 C e E; Tabela A2). Em julho, as folhas da esteva do tratamento AQC exibiram concentrações superiores nos SS ($3.46 \pm 0.25\%$) e nos NSC ($3.81 \pm 0.25\%$).

Os ramos das duas espécies também exibiram uma tendência sazonal nas concentrações de SS, apresentando valores inferiores durante a primavera, aumentando significativamente no verão (Figura 11 D e Figura 12 D). Em julho, observaram-se concentrações máximas de SS nos ramos do sobreiro ($2.32 \pm 0.06\%$ - AQC; $1.94 \pm 0.12\%$ - AQC; $2.27 \pm 0.08\%$ - DQ; $2.10 \pm 0.14\%$ - DQC). No mesmo mês as concentrações de SS também foram máximas nos ramos da esteva ($2.19 \pm 0.61\%$ - AQC; $1.87 \pm 0.30\%$ - DQC). A presença de esteva (invasão) e da seca induzida (água) tiveram um efeito significativo apenas nas concentrações de SS dos ramos do sobreiro (Figura 11 D; Tabela A1). Os ramos dos sobreiros dos tratamentos de invasão apresentaram concentrações de SS inferiores no mês de julho comparativamente aos tratamentos não invadidos. Em março, os ramos dos sobreiros dos tratamentos de seca induzida exibiram concentrações superiores aos dos tratamentos de ambiente. O efeito da interação água*invasão verificou-se nas concentrações de SS e NSC. Apesar das diferenças entre tratamentos não serem significativas, é de destacar a variação nas concentrações de NSC dos ramos do sobreiro entre o tratamento AQC ($2.53 \pm 0.29\%$) e o tratamento DQC ($3.22 \pm 0.28\%$) no mês março. Na esteva, a seca induzida não teve efeito nas concentrações dos compostos dos ramos (Tabela A2). No entanto, quando analisadas as datas separadamente, o tratamento AQC foi significativamente inferior ao DQC ($p < 0.05$) em outubro.

As folhas dos sobreiros exibiram sempre concentrações superiores às dos ramos, exceto em março nas concentrações de amido. Na esteva, as folhas também apresentaram concentrações de SS e NSC superiores aos ramos, exceto em outubro nas concentrações de NSC. As concentrações de amido nos ramos da esteva foram sempre superiores às das folhas. Entre os tecidos das duas espécies, as concentrações dos compostos de amido, SS e NSC diferiram significativamente. As folhas do sobreiro apresentaram concentrações superiores às da esteva. Em outubro, as concentrações de SS nos ramos das duas espécies foram semelhantes.

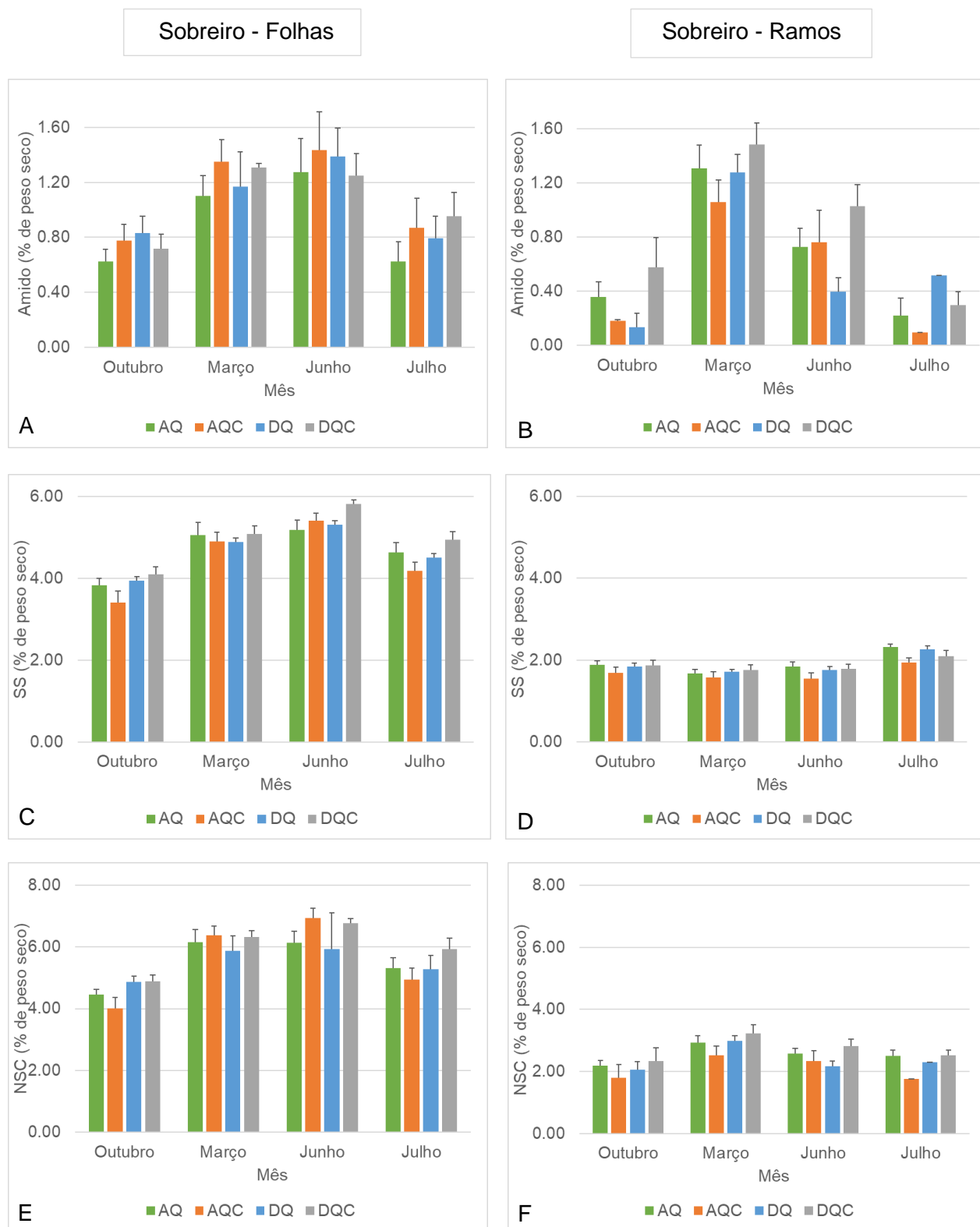


Figura 11 Concentração de amido, açúcares solúveis (SS) e dos totais de NSC (%) nas folhas (esquerda) e ramos (direita) no sobreiro. Os valores representam a média \pm erro padrão dos tratamentos (n diferiu, ver Tabela A3).

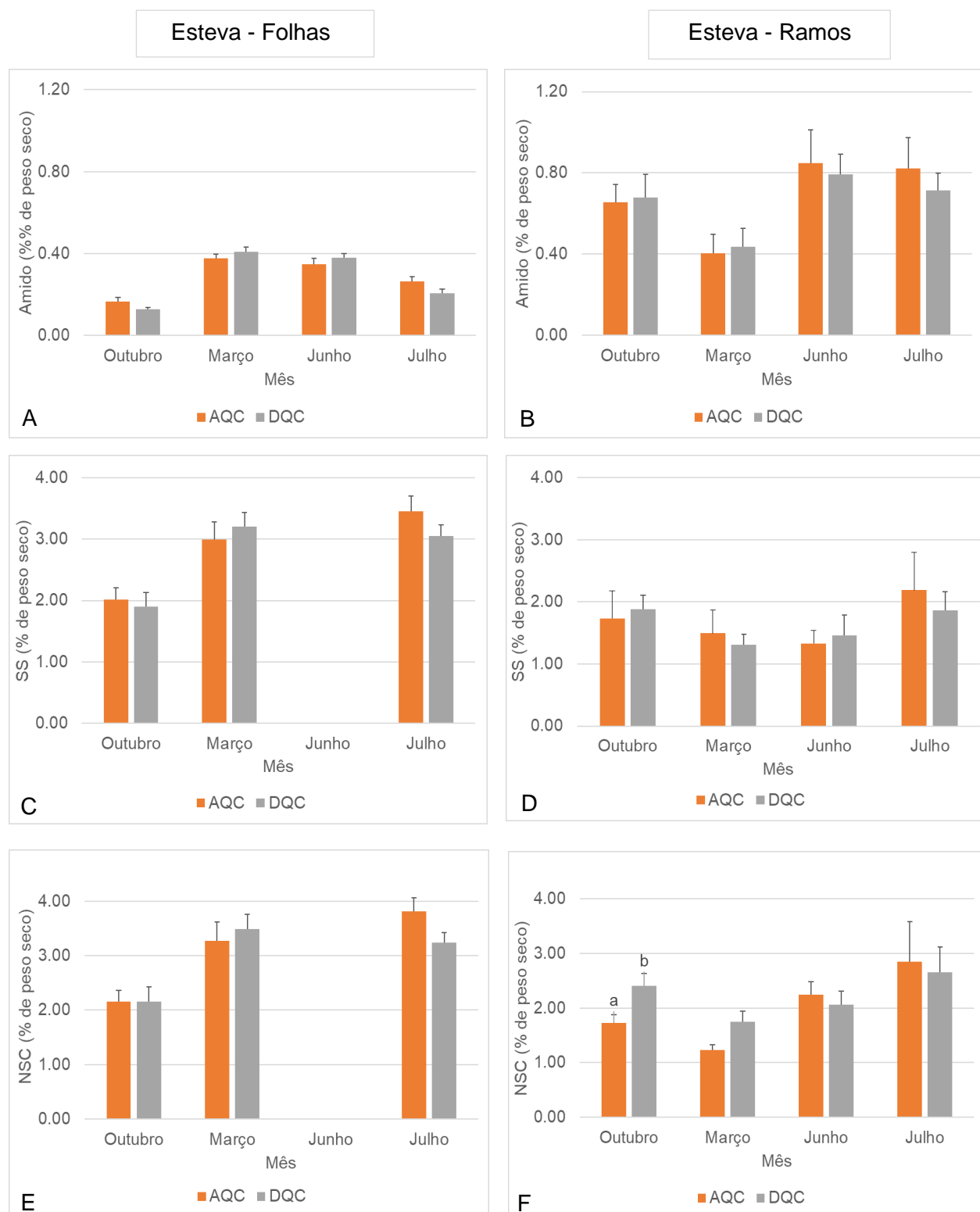


Figura 12 Concentração de amido, açúcares solúveis (SS) e dos totais de NSC (%) nas folhas (esquerda) e ramos (direita) na esteva. Os valores representam a média \pm erro padrão dos indivíduos nos tratamentos (n diferiu, ver Tabela A4). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$).

A relação entre a A_{13h} e as concentrações de amido, SS e NSC foi analisada para as duas espécies (Tabela 3). Como se pode verificar pela Tabela 3, ocorreram correlações significativas ($p < 0.05$), porém estas foram fracas. Como anteriormente referido, o parâmetro A_{13h} no sobreiro registou valores superiores em março, diminuindo desde o início do verão. O mesmo sucedeu na esteva, embora este decréscimo tenha sido menos acentuado durante este período. A correlação negativa ocorrida entre os dois parâmetros nas folhas da esteva resulta do facto da concentração de SS e NSC de julho ser ligeiramente superior à de março, o que indica que embora tenha ocorrido a diminuição da A_{13h} , a esteva assimilou uma maior quantidade de fotoassimilados.

Tabela 3 Coeficiente de correlação de *Spearman* entre a A_{13h} e a concentração do amido, SS e NSC para o sobreiro (*Q.suber*) e esteva (*C.ladanifer*).

		p - value		r
<i>Q.suber</i>	Folhas	Amido	0.09	0.18
		SS	0.03	0.24
		NSC	0.09	0.20

		p - value		r
<i>C.ladanifer</i>	Folhas	Amido	0.01	0.44
		SS	0.44	-0.16
		NSC	0.33	-0.21

4 Discussão

O efeito da seca e da invasão no potencial hídrico foliar e nas trocas gasosas no sobreiro e esteva.

O ano hidrológico (correspondente a 1 de outubro de 2018 a 30 de setembro de 2019), foi um ano seco que se caracterizou essencialmente por uma redução de 34% na precipitação (-197.6 mm) relativamente ao período de referência (Tabela 2), uma vez que a temperatura média do ar foi muito semelhante. Entre 10 de maio e 20 de setembro não ocorreram grandes eventos de precipitação (5.9 mm de precipitação total), o que originou um decréscimo acentuado no teor de água do solo, sobretudo nas profundidades de 0.05 m e 0.20 m (Figura 7). Além da reduzida ocorrência de precipitação, o decréscimo do teor de água no solo resultou muito provavelmente também da evaporação direta de água do solo como resultado do aumento da temperatura e do DPV (Figura 6), assim como da absorção de água pelas raízes, uma vez que maior parte das raízes finas do sobreiro e das raízes da esteva se encontram nas camadas superficiais do solo (Dubbert & Werner, 2019; Dubbert *et al.*, 2019; Kurz-Besson *et al.*, 2006).

A diminuição do teor de água no solo afetou o estado hídrico das plantas entre as amostragens de março e julho. O potencial hídrico de madrugada (Ψ_{pd}), que é determinado pela disponibilidade de água no solo, sofreu um decréscimo tanto no sobreiro como na esteva, entre as respetivas datas (Figura 8) e conduziu à redução da condutância estomática máxima (g_{smax}) tanto do sobreiro como da esteva entre as respetivas datas (Figura 9).

Os resultados deste estudo indicam que o controlo estomático - mecanismo pelo qual as plantas regulam o estado hídrico dentro dos seus limites toleráveis (Martínez-Vilalta & Garcia-Forner, 2017) - durante o período de maior stresse hídrico diferiu entre as duas espécies. Este contraste de respostas aos stresses impostos, resulta não só das diferentes estratégias de uso da água como das características de tolerância à seca entre as duas espécies (Caldeira *et al.*, 2015). O sobreiro possui uma estratégia conservativa do uso da água caracterizado por um forte controlo estomático, reduzindo assim a condutância estomática quando a disponibilidade de água diminui (David *et al.*, 2007; McDowell *et al.*, 2008; Tardieu & Simonneau, 1998;). Esta característica é muito importante nos períodos de stresse hídrico, uma vez que o fecho dos estomas vai limitar as perdas de água pela transpiração, mantendo o potencial hídrico foliar mais elevado e, desta forma, evitando a falência hidráulica (McDowell *et al.*, 2008). De facto, no presente estudo, foi

possível verificar que os sobreiros mantiveram uma margem de segurança hidráulica superior à referida para a espécie, i.e, -2.9 MPa (Pinto *et al.*, 2012). Contudo, estas espécies, caracterizadas por terem um comportamento isohídrico, são mais propensas à carência de carbono, uma vez que com o fecho dos estomas ocorre o decréscimo da taxa de assimilação de CO₂ e as espécies ficam então dependentes das suas reservas de NSC, nomeadamente do amido armazenado, para suportar as suas funções vitais (Martínez-Vilalta & Garcia-Forner, 2017; McDowell *et al.*, 2008).

Por outro lado, a esteva é uma espécie com uma estratégia “gastadora” de água (Caldeira *et al.* 2015). Desta forma, possui um controlo menos restrito dos estomas face a situações de stresse, seguindo as flutuações do ambiente. Isto significa que o potencial hídrico foliar decresce proporcionalmente à diminuição do potencial de água do solo (Ψ_s) (McDowell *et al.*, 2008). Os seus estomas mantêm-se abertos durante um período mais longo permitindo que a taxa assimilação de CO₂ seja mais prolongada e que haja uma maior tolerância a potenciais hídricos mais baixos. Consequentemente, esta espécie pode apresentar um potencial hídrico foliar do meio-dia (Ψ_{md}) próximo do seu limiar de cavitação, isto é, com uma margem de segurança hidráulica muito reduzida, o que por sua vez pode aumentar o risco de falência hidráulica, caso a seca se prolongue (Martínez-Vilalta & Garcia-Forner, 2017; McDowell *et al.*, 2008; Quero *et al.*, 2011). No presente estudo, a margem de segurança hidráulica da esteva nunca foi ultrapassada, uma vez que o Ψ_{md} nunca foi inferior a -6.2 MPa, o valor do Ψ_{50} reportado para a esteva (Quero *et al.*, 2011). Este comportamento, denominado anisohídrico, também tem sido observado em outras espécies tal como, *Acer saccharum* (Ψ_{50} = -4.1 MPa) e *Juniperus osteosperma* (Ψ_{50} = -5.0 MPa) (Koepke & Kolb, 2013; McDowell *et al.*, 2008).

Foram reportados valores de Ψ_{pd} do sobreiro e da esteva, durante um mês de junho com seca moderada a extrema, entre os -0.3 e os -0.4 MPa e entre os -0.5 e os -1.2 MPa, respetivamente (Caldeira *et al.*, 2015; Faria *et al.*, 1996; Kurz-Besson *et al.*, 2014; Lansac *et al.*, 1994; Ramírez *et al.*, 2012). De acordo com Haberstroh (2017), no mesmo sítio experimental, o Ψ_{pd} medido num dia de junho de 2017, caracterizado por ter sido um dia quente (40.9°C) e com VPD elevado (6.2 kPa), foi de -1.06 MPa no sobreiro e -2.24 MPa na esteva. No presente estudo, os valores menores de Ψ_{pd} do sobreiro (-1.25 MPa no tratamento DQC) e da esteva (-2.71 MPa no tratamento AQC) foram de maneira geral, inferiores aos reportados anteriormente e ao do estudo de Haberstroh (2017). De facto, Pereira *et al.*, (1987), refere um limiar de Ψ_{pd} de -1.0 MPa como indicador de stresse hídrico severo para o sobreiro. No entanto, no mês de junho (Figura 8 A), os

sobreiros invadidos por esteva (AQC e DQC) ultrapassaram este limiar. Consequentemente, observou-se uma maior redução da $g_{s_{max}}$ nestes sobreiros, comparativamente aos não invadidos ($0.18 \pm 0.03 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ - AQ e DQ; $0.09 \pm 0.01 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ - AQC e DQC). Os valores reportados no presente estudo, indicam de forma geral, que as espécies já se encontravam em situação de stresse hídrico devido à seca precoce, situação esta agravada nos sobreiros invadidos por esteva, em resultado da competição com esta pela água. O ligeiro aumento do teor de água do solo aos 0.05 m de profundidade, em resultado da precipitação ocorrida antes da amostragem de setembro, permitiu uma ligeira recuperação do Ψ_{pd} nessa data. Esta recuperação foi mais significativa na esteva, em resultado do seu comportamento oportunista na utilização dos recursos hídricos.

A progressão do stresse hídrico levou ao decréscimo da g_s que, durante o mês de julho, foi bastante severo, atingindo valores mínimos de $0.01 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no sobreiro e $0.02 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ na esteva. No mês março, os sobreiros invadidos apresentaram os valores mais baixos de $g_{s_{13h}}$ registados apesar de o Ψ_{md} ter tido valores menos negativos. Esta resposta está muito provavelmente associada à estratégia conservativa de água do sobreiro, de modo a minimizar as perdas de água por transpiração através da regulação estomática.

Durante a amostragem verificou-se que maior parte dos valores de A_{max} ocorreram no período da manhã, como seria de esperar (e.g., Haberstroh et al., 2018; Vaz et al., 2010). Estudos anteriores reportaram valores de A na primavera entre 10 e $14 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no sobreiro e 20 e $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ na esteva (Kurz-Besson et al., 2014; Ramírez et al., 2012; Tenhunen et al. 1985; Vaz et al., 2011). Neste estudo, os valores de A registados na primavera para o período do meio dia, foram semelhantes aos reportados para o sobreiro, exceto para o tratamento DQC, que registou um valor inferior ($8.90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). No entanto, a esteva registou valores inferiores aos reportados para esta altura do ano, tanto no tratamento AQC ($13.89 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) como no DQC ($11.86 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). De acordo com Haberstroh (2017), em junho de 2017 para o mesmo local de estudo, registaram-se valores de $3.04 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no sobreiro e $8.64 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ na esteva. No presente estudo, em junho, o parâmetro A nos sobreiros variou de $3.88 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (DQC) a $5.87 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (AQ), o que foi superior aos valores registados em 2017. Por outro lado, a esteva apresentou valores entre $5.35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (DQC) e $8.69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (AQC). O decréscimo destes valores, para além de comprovarem o facto dos indivíduos já se encontrarem em stresse, vem reforçar a extrema importância da regulação estomática dos sobreiros e consequente diminuição das perdas de água por transpiração em períodos de seca (Vaz et al., 2010). De igual forma, os

mesmos valores demonstram que à medida que a condutância estomática diminui, a taxa de assimilação também diminui. A esteva ao manter a A ligeiramente superior à do sobreiro, demonstra a sua melhor adaptação à seca.

No decorrer do ano hidrológico, a seca induzida não teve um efeito significativo no Ψ de ambas as espécies. Isto resultou muito provavelmente da situação de seca natural que ocorreu, em que o baixo volume de precipitação foi insuficiente para possibilitar uma diferença do teor de água do solo nos diferentes tratamentos. No entanto, a severidade da seca provocou alterações acentuadas no sobreiro, em todos os tratamentos, bem como na esteva, exceto no A_{max} , o que enfatiza as estratégias de resposta à seca por parte desta última espécie.

O efeito da seca e da invasão nas dinâmicas sazonais dos NSC no sobreiro e na esteva.

No decorrer do ano hidrológico, as concentrações dos compostos de amido, SS e NSC variaram entre espécies e tecidos (folhas e ramos). As folhas, através da assimilação de carbono, são a principal fonte de fotoassimilados nas plantas (Chapin *et al.* 1990), tal como se verificou neste estudo, em que as concentrações de NSC foram superiores nas folhas quando comparadas com os ramos. Como anteriormente referido, o amido é um composto de reserva, que é armazenado nas folhas, onde posteriormente é convertido em SS, nomeadamente em sacarose, e translocado para os diversos tecidos da planta, fornecendo suporte nas funções importantes durante o período noturno e em situações de maior stresse, tal como se pôde verificar em julho nas folhas de ambas as espécies.

No presente estudo, também as folhas e os ramos das espécies exibiram uma dinâmica sazonal, associada à disponibilidade de água e fenologia da planta. No caso das folhas, verificou-se que as concentrações dos compostos de amido, SS e NSC foram inferiores no mês de outubro, vindo a aumentar na primavera. Nos ramos, a dinâmica foi mais evidente na esteva, em que as concentrações de amido foram mais reduzidas durante o mês de março, vindo depois a aumentar. Esta observação vem reforçar a ideia de que ocorre a conversão do amido armazenado em sacarose, que posteriormente é mobilizada de forma a suportar e a fornecer os compostos necessários para o crescimento dos novos tecidos, uma vez que em março é quando ocorre a floração da esteva. Relativamente aos tecidos de cada espécie, as folhas do sobreiro apresentaram concentrações de amido, SS e NSC superiores às dos ramos, exceto em março nas concentrações de amido, possivelmente devido à translocação dos compostos das folhas

senescentes para outras partes da planta, que serão depois utilizados na renovação da copa e/ou crescimento do tronco e raízes, nos meses seguintes. O estudo de Cerasoli et al. (2004), reforça a elevada importância dos compostos armazenados nos tecidos mais antigos no suporte do crescimento de novos tecidos. Neste estudo, as concentrações de SS e amido nas folhas do sobreiro em março foram ligeiramente inferiores às de junho, o que está de acordo com o exposto atrás.

Segundo o estudo de Cerasoli et al., (2004), as concentrações de NSC nas folhas de sobreiros com dois anos de idade, variaram entre 12 e 15% durante o mês de março. No verão, os valores reportados de amido e SS nas folhas dos sobreiros, foram entre 3 e 5% e 4 e 9%, respetivamente (Cerasoli et al., 2004; Vaz et al., 2010). As concentrações SS em março destes estudos foram bastante superiores às obtidas no presente trabalho (6.15% - AQ, 6.37% - AQC, 5.88% - DQ e 6.31% - DQC). No entanto, os valores de SS nas folhas de julho encontram-se na mesma gama de concentração, variando de 4.18% (AQC) a 4.94% (DQC). Quanto às concentrações de amido nas folhas, em julho, foram bastante inferiores às reportadas, variando entre 0.63% (AQ) a 0.95% (DQC). No estudo de Cerasoli et al., (2004), durante o verão as concentrações de amido encontravam-se nos 7% e as concentrações de SS entre 4 a 5% nos ramos no sobreiro. Estes valores foram bastante superiores aos registados no presente estudo, em que a concentração de amido variou entre 0.10% (AQC) e 0.52% (DQ) e a concentração de SS variou entre 1.94% (AQC) e 2.32% (AQ). A diferença desta gama de valores pode estar associada à idade das plantas estudadas e à respetiva hora de recolha das amostras, uma vez que as amostras foram recolhidas ao meio-dia, e em situações de stresse hídrico pode haver uma depressão severa da assimilação do carbono, com o consequente consumo dos hidratos de carbono recentemente assimilados. De facto, a A_{13h} encontrava-se severamente inibida no mês de julho, tanto no sobreiro como na esteva. Contudo, a A_{13h} da esteva no mês de julho foi de $1.95 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sendo superior à do sobreiro ($1.52 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), permitindo que as concentrações de SS e NSC se mantivessem altas durante este período de maior seca nesta espécie. No entanto, o estudo de Guimarães et al. (2009) refere que em julho as concentrações de NSC nas folhas é de cerca 8%, o que corresponde a mais do dobro do referido no presente estudo.

As diferenças nas concentrações de amido, SS e NSC entre espécies e tecidos podem ser influenciadas por diversos fatores, tais como: condições ambientais durante o dia da amostragem, hora da realização da amostragem dos tecidos, estratégias das plantas face a períodos de maior stresse, fenologia da planta, estado hídrico das plantas e capacidade dos tecidos armazenarem

os compostos fotossintéticos (Chapin *et al.*, 1990; Faria *et al.*, 1996; Palacio *et al.*, 2018; Rosas *et al.*, 2013). Como já referido, a nível diário as condições ambientais de céu limpo permitem que ocorra um aumento das concentrações dos compostos de NSC. Contudo, as variações de temperatura e precipitação, também podem contribuir para as flutuações destas concentrações. De igual modo, também é de extrema importância realizar a amostragem dos tecidos sempre no mesmo período horário, de forma a evitar a variabilidade diária.

Já a nível sazonal, as concentrações de NSC dependem da fenologia da planta (Chapin *et al.*, 1990; Hartmann & Trumbore, 2016; Rosas *et al.*, 2013;). O sobreiro e a esteva apresentam semelhanças em alguns dos estádios fenológicos, como por exemplo a floração que ocorre de março a junho. No sobreiro, o abrolhamento ocorre durante março e abril, e o aparecimento e maturação dos frutos de julho a dezembro. As folhas do sobreiro, geralmente senescem aquando do abrolhamento (Lobo-do-Vale *et al.*, 2019). Na esteva, a frutificação dá-se entre maio e julho, seguida pela ocorrência da dispersão e germinação entre setembro e março. Já o crescimento vegetativo da esteva acontece durante todo o ano, exceto quando ocorre a floração (Talavera *et al.*, 1993; Varela & Valdivieso, 1996). Desta forma, as concentrações de NSC além de diminuírem aquando da produção de novos tecidos, também dependem da duração e quantidade da produção de semente e do início e fim do crescimento secundário.

Os resultados do presente estudo, também vão de encontro ao anteriormente referido, relativamente às estratégias das duas espécies face a períodos de maior stresse. Embora tenha ocorrido uma redução na *gs* e *A* no fim da primavera, como resultado da seca precoce, os sobreiros dos tratamentos AQC e DQC exibiram maiores concentrações de SS nas folhas comparativamente aos tratamentos AQ e DQ. Este aumento, pode ser resultado do facto de neste período a taxa de crescimento ser mais reduzida comparativamente à fotossíntese, havendo um menor consumo dos compostos fotoassimilados. Durante o verão, a severidade da seca, afetou negativamente *A* e *gs* do sobreiro de todos os tratamentos. Com a diminuição da assimilação de fotoassimilados, o sobreiro ficou dependente das suas reservas de amido para suportar as diversas funções, o que fez com que durante o mês de julho estas diminuíssem, sendo este decréscimo mais acentuado nas folhas dos tratamentos AQ e DQ.

Por outro lado, a capacidade da esteva manter taxas ligeiramente superiores de *A* em condições de stresse, fez com que as concentrações de SS e NSC nas folhas se mantivessem mais elevadas. Contudo a acumulação de reservas nas folhas foi comprometida, dado que as

concentrações de amido eram mais baixas neste período. Já nos ramos, a esteva exibiu concentrações superiores no mês de junho comparativamente aos restantes meses, o que pode resultar do facto destas espécies mobilizarem os seus compostos para a reparação dos vasos do xilema após a cavitação (Zeppel *et al.*, 2019).

A duração e severidade da seca, para além de diminuírem a taxa de crescimento e fotossíntese, também podem conduzir a que as concentrações dos compostos de NSC não variem, uma vez que não ocorre assimilação nem consumo de compostos de carbono (Kannenbergh & Phillips, 2019; Li *et al.*, 2016; Sala *et al.*, 2012). Contudo, as concentrações de NSC podem vir a aumentar após a ocorrência de eventos de precipitação. O estudo de Vaz *et al.* (2010), realizado em folhas do sobreiro, permitiu compreender a importância da ocorrência da precipitação na recuperação da assimilação de carbono e na acumulação dos fotoassimilados. No mesmo estudo, as concentrações de amido e SS nas folhas foram superiores durante o outono (6 e 7%, respetivamente) comparativamente às do verão (4 e 5%, respetivamente), devido à ocorrência das primeiras precipitações. No presente estudo, a amostragem de NSC de outubro correspondeu à primeira data de medição dos parâmetros fisiológicos. Desta forma, esta amostragem antecedeu os primeiros eventos de precipitação ocorridos durante o mês, e por esta razão os valores obtidos no início do outono e no verão foram semelhantes, devido à seca.

Neste estudo, também se verificou que apesar da situação de stresse em que as plantas se encontravam, as reservas dos NSC armazenados nunca ficaram esgotadas. De acordo com outros autores, em que as plantas foram sujeitas a seca induzida (Rosas *et al.*, 2013) ou que enfrentaram um verão extremamente seco (Dietrich *et al.*, 2018), também não se observaram diferenças significativas nas concentrações de NSC entre os tratamentos nem nunca foram esgotadas mesmo em condições extremas (Dietrich *et al.*, 2018; Palacio *et al.*, 2018; Rosas *et al.*, 2013).

5 Conclusão

A capacidade das plantas para suportarem fatores ambientais extremos a que podem estar sujeitas depende das suas características funcionais e do estado fisiológico. O conhecimento antecipado destas características pode contribuir para a melhor compreensão das respostas das plantas a situações de stresse, nomeadamente de secas severas. A necessidade de estudar as dinâmicas dos hidratos de carbono não estruturais, nomeadamente a sua variação temporal e distribuição nos órgãos das plantas é fundamental para compreender a sua contribuição para a sobrevivência da planta em períodos de maior stresse e em particular no contexto das alterações climáticas.

Em suma, neste estudo analisaram-se as respostas do sobreiro (e da esteva) face a tratamentos de seca e de invasão e às condições ambientais prevalecentes durante o ano de estudo. O decréscimo acentuado da precipitação a meio da primavera promoveu o estabelecimento de uma seca precoce. Consequentemente, a disponibilidade de água no solo e os parâmetros das relações hídricas foram afetados drasticamente. Os resultados obtidos confirmaram a tolerância de ambas as espécies a condições de seca, pois uma forte regulação das trocas gasosas permitiu o controlo da cavitação no xilema, assegurando a integridade do sistema condutor, e evitou o esgotamento das reservas de NSC. Embora a esteva tenha mostrado ser uma espécie competidora pelos recursos hídricos, o sobreiro conseguiu manter concentrações de NSC superiores nos seus tecidos comparativamente à esteva. De igual modo, o presente estudo demonstrou o elevado grau de resiliência dos sobreiros em resposta à falta de água, e à invasão pelos arbustos, que tiveram o efeito de ainda diminuir mais a disponibilidade de água para os sobreiros. De maneira geral, o sobreiro demonstrou uma grande capacidade adaptativa face aos períodos de seca, em particular os sobreiros nas parcelas invadidas por esteva. A esteva, por outro lado, demonstrou ser uma espécie também resiliente à seca, com elevada capacidade competitiva pela água e de resposta rápida a um aumento da disponibilidade em água, como acontece com as primeiras chuvas após seca prolongada.

Em estudos futuros, será interessante incluir o estudo da dinâmica dos NSC noutros tecidos vegetais, nomeadamente nas raízes e *lignotuber*. Igualmente, não só será interessante estudar a variabilidade diária das concentrações de NSC, através da recolha de material em diversas horas, como conduzir o estudo por mais anos, observando assim o que poderá suceder com as reservas de NSC caso os eventos de seca sejam recorrentes.

6 Referências bibliográficas

Acácio, V., Holmgren, M., Rego, F., Moreira, F., Mohren, G.M.J. (2009). Are drought and wildfires turning Mediterranean cork oak forests into persistent shrublands?. *Agroforestry Systems* 76, 389-400.

APCOR (2018): <https://www.apcor.pt>, 27 de março de 2020.

Aronson, J., Pereira, J. S., Pausas, J. G. (2011). *Cork oak woodlands on the edge: Ecology, Adaptive Management, and restoration*. Island Press, Washington, DC.

Bugalho, M. N., Caldeira, M. C., Pereira, J. S., Aronson, J., Pausas, J. G. (2011). Mediterranean cork oak savannas require human use to sustain biodiversity and ecosystem services. *Frontiers in Ecology and the Environment* 9, 278-286.

Caldeira, M. C., Lecomte, X., David, T. S., Pinto, J. G., Bugalho, M. N, Werner, C. (2015). Synergy of extreme drought and shrub invasion reduce ecosystem functioning and resilience in water-limited climates. *Scientific Reports* 5, 15110.

Caldeira, M.C. (2019). The timing of drought coupled with pathogens may boost tree mortality. *Tree Physiology* 39, 1-5.

Cerasoli, S., Maillard, P., Scartazza, A., Brugnoli, E., Chaves, M. M., Pereira, J. S. (2004). Carbon and nitrogen winter storage and remobilisation during seasonal flush growth in two-year-old cork oak (*Quercus suber* L.) saplings. *Annals of Forest Science* 61, 721–729.

Chapin, F. S., Schulze, E., Mooney, H. A. (1990). The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21, 423–447.

Choat, B., Brodribb, T. J., Brodersen, C. R., Duursma, R. A., López, R., Medlyn, B. E. (2018). Triggers of tree mortality under drought. *Nature* 558, 531-539.

Choat, B., Jansen, S., Brodribb, T. J., Cochard, H., Delzon, S., Bhaskar, R., Bucci, S. J., Feild, T. S., Gleason, S. M., Hacke, U. G, Jacobsen, A.L., Lens, F., Maherali, H., Martinez-Vilalta, J., Mayr,

S., Mencuccini, M., Mitchell, P.J., Nardini, A., Pittermann, J., Pratt, R. B., Sperry, J. S., Westoby, M., Wright, I. J., Zanne, A.E. (2012). Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nature* 491, 752–755.

Costa, A., Pereira, C. (2007). Manual de Instalação de Novos Povoamentos com Sobreiro. Aplicação de Boas Práticas nas Regiões da Chamusca e de Álcacer do Sal. ISA, ERENA, ANSUB, ACHAR, Lisboa.

David, T. S., Henriques, M. O., Nunes, J., Valente, F., Vaz, M., Pereira, J. S., Siegwolf, R., Chaves, M. M., Gazarini, L. C., David, J. S. (2007). Water-use strategies in two co-occurring Mediterranean evergreen oaks: surviving the summer drought. *Tree Physiology* 27, 793–803.

David, T. S., Pinto, C. A., Nadezhdina, N., Kurz-Besson, C., Henriques, M. O., Quilhó, T., Cermak, J., Chaves, M. M., Pereira, J. S., David, J. S. (2013). Root functioning, tree water use and hydraulic redistribution in *Quercus suber* trees: A modeling approach based on root sap flow. *Forest Ecology and Management* 307, 136–146.

Díaz, M., Campos, P., Pulido, F. J. (1997). The Spanish dehesas: A diversity in land-use and wildlife. In: The common agricultural policy and its implications for bird conservation. Pain, D.J., Pienkowski, M.W., eds. Academic Press, ISBN: 9780125442800, London, UK.

Dietrich, L., Delzon, S., Hoch, G., Kahmen, A. (2018). No role for xylem embolism or carbohydrate shortage in temperate trees during the severe 2015 drought. *Journal of Ecology* 107, 334–349.

Dietze, M. C., Sala, A., Carbone, M. S., Czimczik, C. I., Mantooth, J. A., Richardson, A. D., Vargas, R. (2014). Nonstructural Carbon in Woody Plants. *Annual Review of Plant Biology* 65, 667-687.

Dubbert, M., Caldeira, M.C., Dubbert, D., Werner, C. (2019). A pool-weighted perspective on the two-water-worlds hypothesis. *New Phytologist* 222, 1271-1283.

Dubbert, M., Werner, C. (2019). Water fluxes mediated by vegetation: Emerging isotopic insights at the soil and atmosphere interfaces. *New Phytologist* 221, 1754–1763.

Escudero, A., Del Arco, J.M., Sanz, I.C. and Ayala, J. (1992). Effects of Leaf Longevity and Retranslocation Efficiency on the Retention Time of Nutrients in the Leaf Biomass of Different Woody Species. *Oecologia* 90, 80-87.

Faria, T., García-Plazoala, J. I, Abadía, A., Cerasoli, S., Pereira, J. S., Chaves, M. M. (1996). Diurnal changes in photoprotective mechanisms in leaves of cork oak (*Quercus suber*) during summer. *Tree Physiology* 16, 115-123.

Fialho, C., Lopes, F., Pereira, H. (2001). The effect of cork removal on the radial growth and phenology of young cork oak trees. *Forest Ecology and Management* 141, 251-258.

Frazão, D. F., Raimundo, J. R., Domingues, J. L., Quintela, C., José, S., Delgado, F. (2018). *Cistus ladanifer* (Cistaceae): a natural resource in Mediterranean - type ecosystems. *Planta* 247, 289–300.

Guimarães, R., Barros, L., Carvalho, A. M., Sousa, M. J., Morais, J. S., Ferreira, I. C. F. R. (2009). Aromatic plants as a source of important phytochemicals: Vitamins, sugars and fatty acids in *Cistus ladanifer*, *Cupressus lusitânica* and *Eucalyptus gunni* leaves. *Industrial Crops and Products* 30, 427-430.

Haberstroh S. (2017). Master Thesis BVOC Emissions of *Quercus suber* VOC-Emissions of *Quercus suber* and *Cistus ladanifer* in response and *Cistus ladanifer* in response to Drought Stress to drought stress Master of Science. University of Freiburg, Germany. 47p.

Haberstroh, S., Kreuzwieser, J., Lobo-do-Vale, R., Caldeira, M.C., Dubbert, M., Werner, C. (2018). Terpenoid Emissions of Two Mediterranean Woody Species in Response to Drought Stress. *Frontiers in Plant Science* 9, 1071.

Hammond, W.M., Yu, K., Wilson, L.A., Will, R.E., Anderegg, W.R.L., Adams, H.D. (2019). Dead or dying? Quantifying the point of no return from hydraulic failure in drought-induced tree mortality. *New Phytologist* 223, 1834-1843.

Hartmann, H., Trumbore, S. (2016). Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees - from what we can measure to what we want to know. *New Phytologist* 211, 386–403.

Hartmann, H., Adams, H. D., Hammond, W. M., Hoch, G., Landhäusser, S. M., Wiley, E., Zaehle, S. (2018). Identifying differences in carbohydrate dynamics of seedlings and mature trees to improve carbon allocation in models for trees and forests. *Environmental and Experimental Botany* 152, 7–18.

Humpheries, C. J., Press, J. R., Sutton, D. A. (2005). *Árvores de Portugal e Europa. Guia FAPAS - Fundo para a Proteção dos Animais Selvagens*. 320p.

ICNF (2015). 6º Inventário Florestal Nacional. Atualizado a 21 de novembro de 2019. Lisboa, Portugal.

IPCC (2007). *Climate change 2007: impacts, adaptation and vulnerability*, In: Parry, M.L., Canziani, O. F., Palutikof, J. P., van der Linden, P. J., Hanson, C. E. (Eds.), *Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.

IPCC. *Climate Change (2014); Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*; IPCC: Geneva, Switzerland, 2014. p. 151.

IPMA (2020): *Boletim Climático Anual*: <http://www.ipma.pt/pt/publicacoes/boletins.jsp?cmbDep=cli&cmbTema=pcl&cmbAno=2019&idDep=cli&idTema=pcl&currAno=2019>, 8 janeiro 2020.

IUSS Working Group WRB. (2006). *World reference Base for Soil Resources 2006. World Soil Resources Reporte 103*, FAO, Rome. 186 pp.

Kannenberg, S.A., Phillips, R.P. (2019). Non-structural carbohydrate pools not linked to hydraulic strategies or carbon supply in tree saplings during severe drought and subsequent recovery. *Tree Physiology* 40, 259-271.

Koepke, D.F., Kolb, T.E. (2013). Species variation in water relations and xylem vulnerability to cavitation at a forest-woodland ecotone. *Forest Science* 59, 524–535.

Kurz-Besson, C., Lobo-do-Vale, R., Rodrigues, M. L., Almeida, P., Herd, A., Grant, O. M., David, T. S., Schmidt, M., Otieno, D., Keenan, T. F., Gouveia, C. Mériaux, C., Chaves, M. M, Pereira, J. J. (2014). Cork oak physiological responses to manipulated water availability in a Mediterranean woodland. *Agricultural and Forest Meteorology* 184, 230–242.

Kurz-Besson, C., Otieno, D., Lobo-do-Vale, R., Siegwolf, R., Schmidt, M. W. T., David, T. S., David, J., Tenhunen, J., Pereira, J. S. (2006). Hydraulic lift in cork oak trees in a savannah-type Mediterranean ecosystem and its contribution to the local water balance. *Plant and Soil* 282, 361–378.

Landhäusser, S. M., Chow, P. S., Dickman, L. T., Furze, M. E., Kuhlman, I., Schmid, S., Wiesenbauer, J., Wild, B., Gleixner, G., Hartmann, H., Hoch, G., McDowell, N. G., Richardson, A. D., Richter, A., Adams, H. D. (2018). Standardized protocols and procedures can precisely and accurately quantify non-structural carbohydrates. *Tree Physiology*, 38, 1764–1778.

Lansac, A. R., Zaballos, J. E., Martin, A. (1994). Seasonal water potential changes and proline accumulation in mediterranean shrubland species. *Vegetatio* 113, 141–154.

Lecomte, X., Caldeira, M.C., Bugalho, M.N., Fedriani, J.M. (2017). Combined effects of deer, mice and insect seed predation on the reproductive success of a Mediterranean shrub. *Basic and Applied Ecology* 21, 45-54.

Lobo-do-Vale, R., Besson, C.R., Caldeira, M.C., Chaves, M.M., Pereira, J.S. (2019). Drought reduces tree growing season length but increases nitrogen resorption efficiency in a Mediterranean ecosystem. *Biogeosciences* 16, 1265-1279.

Li, N., He, N., Yu, G., Wang, Q., Sun, J. (2016). Leaf non-structural carbohydrates regulated by plant functional groups and climate: Evidences from a tropical to cold-temperate forest transect. *Leaf non-structural carbohydrates regulated by plant functional groups and climate: Evidences from a tropical to cold-temperate forest transect. Ecological Indicators* 62, 22–31.

Lindner, M., Maroschek, M., Netherer, S., Kremer, A., Barbati, A., Garcia-Gonzalo, J., Seidl, R., Delzon, S., Corona, P., Kolström, M., Lexer, M.J., Marchetti, M. (2010). Climate change impacts, adaptive capacity, and vulnerability of European forest ecosystems. *Forest Ecology and Management* 259, 698–709.

Magwaza, L. S. & Opara U. L. (2015). Analytical methods for determination of sugars and sweetness of horticultural products – A review. *Scientia Horticulturae* 184, 179–192.

Martínez-Vilalta, J., Garcia-Forner, N. (2017). Water potential regulation, stomatal behaviour and hydraulic transport under drought: deconstructing the iso/anisohydric concept. *Plant, Cell & Environment* 40, 962–976.

Martínez-Vilalta, J., Sala, A., Asensio, D., Galiano, L., Hoch, G., Palacio, S., Piper, F. I., Lloret, F. (2016). Dynamics of non-structural carbohydrates in terrestrial plants: A global synthesis. *Ecological Monographs* 86, 495–516.

McDowell, N. G. (2011). Mechanisms Linking Drought, Hydraulics, Carbon Metabolism, and Vegetation Mortality. *Plant Physiology* 155, 1051–1059.

McDowell, N. G., Beerling, D. J., Breshears, D. D., Fisher, R. A., Raffa, K. F., Stitt, M. (2011). The interdependence of mechanisms underlying climate-driven vegetation mortality. *Trends in Ecology & Evolution* 26, 523–532.

McDowell, N., Pockman, W. T., Allen, C. D., David, D., Cobb, N., Kolb, T., Plaut, J., Sperry, J., West, A., Williams, D. G., Yepez, E.A. (2008). Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought?. *New Phytologist* 178, 2720–2730.

Mitchell, P. J., O'Grady, A. P., Tissue, D. T., White, D. A., Ottenschlaeger, M. L., Pinkard, E. A. (2013). Drought response strategies define the relative contributions of hydraulic dysfunction and carbohydrate depletion during tree mortality. *New Phytologist* 197, 862–872.

Moreno-Marcos, G., Obrador, J. J., García, E., Curbera, E., Montero, M. J., Pulido, F. & Dupraz, C. (2007). Driving competitive and facilitative interactions in oak dehesas through management practices. *Agroforestry Systems*, 70, 25–40.

Natividade, J. V. (1950). *Subericultura*, Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas, Lisboa. 387p.

Otieno, D. O., Schmidt, M. W. T, Kurz-Besson, C., Lobo-Do-Vale, R., Pereira, J. S., Tenhunen, J. D. (2007). Regulation of transpirational water loss in *Quercus suber* trees in a Mediterranean-type ecosystem. *Tree Physiology* 27, 1179–1187.

Palacio, S., Camarero, J.J., Maestro, M., Alla, A.Q., Lahoz, E., Montserrat-Martí, G. (2018). Are storage and tree growth related? Seasonal nutrient and carbohydrate dynamics in evergreen and deciduous Mediterranean oaks. *Trees* 32, 777–790.

Pereira, J. S., Beyschlag, G., Lange, O. L., Beyschlag, W., and Tenhunen, J. D. (1987). Comparative phenology of four mediterranean shrub species growing in Portugal, in: *Plant Responses to Stress*, edited by: Tenhunen, J. D., Catarino, F. M., Lange, O. L., and Oechel, W. C., NATO ASI Series, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 503-513, 1987.

Pinto, C. A., David, J. S., Cochard, H., Caldeira, M. C., Henriques, M. O., Quilhó, T., Paço, T. A., Pereira, J. S., David, T. S. (2012). Drought-induced embolism in current-year shoots of two Mediterranean evergreen oaks. *Forest Ecology and Management* 285, 1–10.

Quentin, A. G., Pinkard, E. A., Ryan, M. G., Tissue, D. T., Baggett, L. S., Adams, H. D., Maillard, P., Marchand, J., Landhäusser, S. M., Lacointe, A., et al. (2015). Non-structural carbohydrates in woody plants compared among laboratories. *Tree Physiology* 35, 1146–1165.

Quero, J. L., Sterck, F. J., Martínez-Vilalta, J., Villar, R. (2011). Water-use strategies of six co-existing Mediterranean woody species during a summer drought. *Oecologia* 166, 45–57.

Raessler, M. (2011). Sample preparation and current applications of liquid chromatography for the determination of non-structural carbohydrates in plants. *Trends in Analytical Chemistry* 30, 1833–1843.

Raimundo, J. R., Frazão, D. F., Domingues, J. L., Quintela, C., Teresa, S., Anjos, O., Alves, M., Delgado, F. (2018). Neglected Mediterranean plant species are valuable resources: the example of *Cistus ladanifer*. *Planta* 248, 1351–1364.

Ramírez, D. A., Parra, A., Resco de Dios, V., Moreno, J. M. (2012). Differences in morpho-physiological leaf traits reflect the response of growth to drought in a seeder but not in a resprouter Mediterranean species. *Functional Plant Biology* 39, 332-341.

Ramirez, J. A., Posada, J. M., Handa, I. T., Hoch, G., Vohland, M., Messier, C., Reu, B. (2015). Near-infrared spectroscopy (NIRS) predicts non-structural carbohydrate concentrations in different tissue types of a broad range of tree species. *Methods in Ecology and Evolution* 6, 1018–1025.

Reichstein, M., Bahn, M., Ciais, P., Frank, D., Mahecha, M. D., Seneviratne, S. I., Zscheischler, J., Beer, C., Buchmann, N., Frank, D. C., Papale, D., Rammig, A., Smith, P., Thonicke, K., van der Velde, M., Vicca, S., Walz, A., Wattenbach, M. (2013). Climate extremes and the carbon cycle. *Nature* 500, 287–295.

Rodrigues, J., Faix, O., Pereira, H. (1998). Determination of Lignin Content of *Eucalyptus globulus* Wood Using FTIR Spectroscopy. *Walter de Gruyter* 52, 46-50.

Rosas, T., Galiano, L., Ogaya, R., Peñuelas, J., Martínez-Vilalta, J. (2013). Dynamics of non-structural carbohydrates in three Mediterranean woody species following long-term experimental drought. *Frontiers in Plant Science* 4, 1–16.

Sala, A., Woodruff, D. R., Meinzer, F. C. (2012). Carbon dynamics in trees: Feast or famine? *Tree Physiology* 32, 764–775.

Sevanto, S., McDowell, N. G., Dickman, L. T., Pangle, R., Pockman, W. T. (2014). How do trees die? A test of the hydraulic failure and carbon starvation hypotheses. *Plant, Cell and Environment* 37, 153–161.

Talavera, S., Gibbs, P., Herrera, J. (1993). Reproductive biology of *Cistus ladanifer*. *Plant Systematics and Evolution* 186, 123-134.

- Tardieu, F., Simonneau, T. (1998). Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of Experimental Botany* 49, 419-432.
- Tenhunen, J. D., Lange, O. L., Harley, P. C., Beyschlag, W., Mayer, A. (1985). Limitations due to water stress on leaf net photosynthesis of *Quercus coccifera* in the Portuguese evergreen scrub. *Oecologia* 67, 23–30.
- Varela, M.C., Valdivieso, T. (1996). Phenological phases of *Quercus suber* L. flowering. *Forest Genetics* 3, 93-102.
- Vaz, M., Maroco, J., Ribeiro, N., Gazarini, L. C., Pereira, J. S., Chaves, M. M. (2011). Leaf-level responses to light in two co-occurring *Quercus* (*Quercus ilex* and *Quercus suber*): leaf structure, chemical composition and photosynthesis. *Agroforestry Systems* 82, 173–181.
- Vaz, M., Pereira, J. S., Gazarini, L. C., David, T. S., David, J. S., Rodrigues, A., Maroco, J., Chaves, M. M. (2010). Drought-induced photosynthetic inhibition and autumn recovery in two Mediterranean oak species (*Quercus ilex* and *Quercus suber*). *Tree Physiologist* 30, 946–956.
- Vicente-Serrano, S. M., Gouveia, C., Julio, J., Beguería, S., Trigo, R. (2012). Response of vegetation to drought time-scales across global land biomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 52-57.
- Viceto, C., Pereira, S. C., Rocha, A. (2019). Climate Change Projections of Extreme Temperatures for the Iberian Peninsula. *Atmosphere* 10, 229.
- Zeppel, M.J.B., Hudson, P., Anderegg, W.R.L., Adams, H.D., Cook, A., Rumman, R., Eamus, D., Tissue DT, Pacala SW. (2019). Embolism recovery strategies and nocturnal water loss across species influenced by biogeographic origin. *Ecology and Evolution* 9, 5348–5361.

7 Anexos

Tabela A1 Síntese do GLM dos efeitos dos fatores no sobreiro (*Q.suber*) medidos nas respectivas datas de cada parâmetro. A referência (F) representa as folhas e o (R) representa os ramos dos indivíduos. Os modelos de GLM incluíram o “bloco” como fator aleatório e a “água”, “invasão” e “data” como fator fixo. Os resultados mostram a razão das duas variâncias (F) e a significância da probabilidade (p-value). Para p-value < 0.05 existe significância. O número “n” de indivíduos encontra-se na Tabela A3.

Parâmetro	Fator								Interações							
	Bloco		Data		Água		Invasão		Data*Água		Data*Invasão		Água*Invasão		Data*Água*invasão	
	F	p-value	F	p-value	F	p-value	F	p-value	F	p-value	F	p-value	F	p-value	F	p-value
SWC - 0.05	0.100	0.905	131.284	<0.001	0.836	0.365	7.013	0.011	0.222	0.968	0.225	0.967	0.140	0.710	0.321	0.923
SWC - 0.20	0.037	0.964	23.876	<0.001	0.012	0.913	0.765	0.385	0.266	0.950	0.144	0.989	12.104	0.001	0.332	0.917
SWC - 0.40	0.096	0.909	7.529	<0.001	0.217	0.643	7.866	0.007	0.147	0.989	1.692	0.141	15.644	<0.001	0.396	0.878
Ψ_{pd}	0.155	0.86	804.149	<0.001	1.207	0.273	25.075	<0.001	4.242	<0.001	3.254	0.004	12.785	<0.001	2.893	0.010
Ψ_{md}	0.620	0.94	135.085	<0.001	0.498	0.481	21.006	<0.001	3.073	0.011	4.740	<0.001	4.155	0.043	7.160	<0.001
A_{13h}	0.723	0.49	86518.059	<0.001	8.719	0.004	190.267	<0.001	815.711	<0.001	2325.153	<0.001	120.907	<0.001	1019.515	<0.001
gs_{13h}	0.218	0.80	1507.515	<0.001	4.762	0.032	163.136	<0.001	9.017	<0.001	59.882	<0.001	11.340	0.001	35.829	<0.001
A_{max}	0.438	0.65	475.867	<0.001	6.146	0.014	11.722	0.001	7.319	<0.001	5.567	0.001	17.227	<0.001	5.656	0.001
gs_{max}	0.103	0.90	990.075	<0.001	43.281	<0.001	27.545	<0.001	18.265	<0.001	10.582	<0.001	16.208	<0.001	3.224	0.025
Amido (F)	0.100	0.91	102.708	<0.001	16.912	<0.001	28.878	<0.001	21.684	<0.001	16.273	<0.001	0	0.664	6.534	<0.001
SS (F)	0.260	0.77	128.294	<0.001	1.682	0.198	0.051	0.822	5.988	0.001	6.172	0.001	8.392	0.005	1.895	0.135
NSC (F)	0.031	0.97	108.123	<0.001	7.158	0.009	13.524	<0.001	12.951	<0.001	0.879	0.456	0	0.990	3.496	0.019
Amido (R)	0.085	0.92	39634.990	<0.001	0.402	0.528	0.053	0.818	110.820	<0.001	908.231	<0.001	1.572	0.214	5197.246	<0.001
SS (R)	0.175	0.84	113.502	<0.001	36.284	<0.001	8.485	0.004	4.154	0.008	10.557	<0.001	160.842	<0.001	4.590	0.004
NSC (R)	0.014	0.99	34.922	<0.001	0.747	0.390	0.804	0.373	1.519	0.217	3.494	0.020	7.861	0.007	4.454	0.006

Tabela A2 Síntese do GLM dos efeitos dos fatores na esteva (*C. ladanifer*) medidos nas respectivas datas de cada parâmetro. A referência (F) representa as folhas e o (R) representa os ramos dos indivíduos. Os modelos de GLM incluíram o “bloco” como fator aleatório e a “água” e “data” como fator fixo. Os resultados mostram a razão das duas variâncias (F) e a significância da probabilidade (p-value). Para p-value < 0.05 existe significância. O número “n” de indivíduos encontra-se na Tabela A4.

Parâmetro	Fator						Interação	
	Bloco		Data		Água		Data*Água	
	F	p-value	F	p-value	F	p-value	F	p-value
Ψ_{pd}	0.17	0.84	2318.750	<0.001	1.519	0.220	11.079	<0.001
Ψ_{md}	0.659	0.52	535.652	<0.001	0.465	0.497	5.123	<0.001
A_{13h}	0.128	0.88	12550.081	<0.001	99.669	<0.001	308.727	<0.001
gs_{13h}	0.103	0.90	9223.254	<0.001	1287.266	<0.001	1356.929	<0.001
A_{max}	0.207	0.81	31794.293	<0.001	2.251	0.139	121.770	<0.001
gs_{max}	0.168	0.85	643.004	<0.001	29.294	<0.001	42.232	<0.001
Amido (F)	0.413	0.66	362.525	<0.001	0.559	0.458	105.457	<0.001
SS (F)	0.156	0.86	1010.270	<0.001	136.030	<0.001	1.797	0.180
NSC (F)	0.131	0.88	80.749	<0.001	16.540	<0.001	22.703	<0.001
Amido (R)	0.058	0.94	142.649	<0.001	3.632	0.063	27.700	<0.001
SS (R)	0.523	0.60	76.661	<0.001	4.074	0.051	21.758	<0.001
NSC (R)	0.226	0.80	27.570	<0.001	0.535	0.470	8.600	<0.001

Tabela A3 Valores referentes ao número (n) de indivíduos de sobreiro (*Q. suber*) nas folhas e ramos no período de amostragem de NSC.

		Amido - Folhas				SS - Folhas				NSC - Folhas			
		outubro	março	junho	julho	outubro	março	junho	julho	outubro	março	junho	julho
Tratamento	AQ	7	9	9	5	9	7	4	9	7	7	4	5
	AQC	6	7	8	6	9	8	7	9	6	6	6	6
	DQ	6	8	9	7	8	7	4	9	5	6	4	7
	DQC	7	7	9	8	9	7	6	9	7	6	6	8

		Amido - Ramos				SS - Ramos				NSC - Ramos			
		outubro	março	junho	julho	outubro	março	junho	julho	outubro	março	junho	julho
Tratamento	AQ	6	6	9	4	9	9	9	9	6	6	9	4
	AQC	2	8	6	1	9	8	9	9	2	7	6	1
	DQ	4	9	8	1	9	9	9	9	4	9	8	1
	DQC	3	8	9	7	9	8	9	9	3	7	9	7

Tabela A4 Valores referentes ao número (n) de indivíduos de esteva (*C. ladanifer*) nas folhas e ramos no período de amostragem de NSC.

		Amido - Folhas				SS - Folhas				NSC - Folhas			
		outubro	março	junho	julho	outubro	março	junho	julho	outubro	março	junho	julho
Tratamento	AQC	7	8	7	8	9	7	0	6	7	6	0	5
	DQC	7	6	9	9	9	5	0	8	7	4	0	8

		Amido - Folhas				SS - Folhas				NSC - Folhas			
		outubro	março	junho	julho	outubro	março	junho	julho	outubro	março	junho	julho
Tratamento	AQC	6	5	9	8	6	8	8	4	4	4	8	4
	DQC	8	7	8	6	5	8	6	3	4	6	5	3